

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**TESE DE DOUTORADO**

**THIAGO DE CASTRO GOMES**

**CITÓLISE MEDIADA PELA LEISHPORINA DE  
*LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*:**

REQUISITOS PARA A LIGAÇÃO DA CITOLISINA À MEMBRANA,  
VISUALIZAÇÃO DE ESTRUTURAS *PORE-LIKE* E ESTRATÉGIAS PARA  
SUA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

**ORIENTADORA**

**MARIA DE FÁTIMA MARTINS HORTA**

**Novembro – 2010**

**O maior inimigo da verdade não é a mentira, mas sim a convicção.**

**FRIEDRICH NIETZSCHE**

Este trabalho recebeu auxílio financeiro das seguintes instituições:

**CAPES - CNPq - FAPEMIG - OMS**

Dedico este trabalho à minha mulher,  
por sua inteligência, integridade, espírito crítico  
e principalmente pelo fato de ter aceitado se casar  
com alguém que passará a vida inteira estudando.

## **AGRADECIMENTOS**

No âmbito profissional, agradeço aos amigos de laboratório, à professora Santuza e a todos aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia que, direta ou indiretamente, me propiciaram uma excelente formação. Durante a realização deste projeto, a ajuda de alguns professores foi absolutamente fundamental. Deste modo, gostaria de agradecer de modo especial aos seguintes profissionais: À Professora Fátima Noronha que me ajudou a dar os primeiros passos neste projeto. Ao Prof. Frédéric Frézard do Departamento de Biofísica que me ensinou a trabalhar com lipossomos, muitos de meus resultados devo a ele. Ao Jamil, sem cuja ajuda também não teria alcançado os mais importantes resultados deste trabalho. Aos professores Marcelo Porto Bemquerer e Luciano Paulino, ambos da EMBRAPA-CENARGEM de Brasília, que com extrema competência, simpatia, disponibilidade e espírito crítico me ensinaram a trabalhar com espectrometria de massas, o que resultou em excelentes resultados. Um agradecimento especial à professora Héliida, que também me ajudou a dar os primeiros passos com espectrometria de massas, e aos doutores Alexander e Jonas Perales, ambos da Ficocruz do Rio de Janeiro, pois a colaboração com os mesmos foi fundamental para muitos de nossos resultados. Com a mesma ênfase agradeço à Dra Rosiane por termos compartilhado bons momentos de colaboração, sua ajuda foi muito importante. Um grande agradecimento ao Dr José Mário Vilela que me auxiliou, ensinou e possibilitou o aprendizado da fantástica técnica de microscopia de força atômica.

No âmbito pessoal, agradeço aos meus pais, que me propiciaram a formação como biólogo, à minha irmã e ao meu cunhado Marcelo que há anos atrás conseguiu para mim o primeiro estágio em pesquisa e, principalmente, ao meu irmão Dênio e à minha cunhada Kelle que me garantiram um teto em Belo Horizonte quando eu ainda estava no mestrado.

Entretanto, meu maior agradecimento sem dúvida alguma vai à professora Maria de Fátima Horta, minha orientadora, a qual eu não soube ao certo se incluía no primeiro ou no segundo parágrafo destes agradecimentos. Solução simples e justa: concedo-lhe um parágrafo inteiro. Toda minha formação intelectual e pessoal nos últimos oito anos tem na Patiu sua principal base de sustentação. Tive o apoio de seu intelecto superior e o seu comprometimento para comigo e para com o projeto em todas as etapas deste trabalho. Sei da importância deste projeto para sua carreira e me sinto honrado com a responsabilidade a mim confiada. Sua forma sempre humana de encarar os alunos e a relação que comigo estabeleceu ultrapassam as bancadas de laboratório. Tive seu apoio, alento e amizade durante momentos que foram muito difíceis em minha vida pessoal e pude perceber a

grandeza do ser humano que me orientou, tanto pelos caminhos da ciência, quanto pelos caminhos da vida. Tivemos um excelente entendimento profissional e pessoal. Não tenho dúvida alguma de que tal entendimento foi fundamental para o sucesso do presente trabalho e as alegrias que com ele tivemos, como o paper publicado, os que ainda virão e os prêmios que juntos recebemos em alguns congressos. A ela dedico meus agradecimentos de aluno e amigo e a ela atribuo a maior parte do sucesso obtido. Terminei este trabalho e despeço-me do projeto que por anos abracei deixando algum avanço, mas principalmente levando comigo uma enorme gratidão pelo aprendizado obtido e o mais sincero e profundo respeito pela amizade construída.

## RESUMO

Chamamos de leishporina uma citolisina que foi descrita pelo nosso grupo inicialmente em *L. amazonensis*, mas cuja atividade citolítica foi também detectada em *L. major*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Noronha, 1996; Noronha et al., 1996). A atividade citolítica de *L. amazonensis* foi detectada em promastigotas e amastigotas, mas toda a caracterização desta atividade foi feita em promastigotas. Assim, nosso grupo mostrou que promastigotas contêm uma atividade lítica capaz de lisar hemácias e células nucleadas, incluindo o macrófago, a célula hospedeira do gênero *Leishmania* (Noronha et al., 1996). Posteriormente, utilizando a técnica de *patch-clamp*, nosso grupo mostrou que a lesão celular causada pelo extrato do parasita é mediada pela formação de poros não seletivos na membrana-alvo, demonstrando que a citolisina de *L. amazonensis* é uma citolisina formadora de poros, de onde veio o nome leishporina (Noronha et al., 2000). O fato de parasitas do gênero *Leishmania*, causadores de diversas formas de leishmaniose, possuírem uma molécula formadora de poros gera a questão óbvia de qual seria a sua função. A resposta a esta questão depende, no entanto, de conhecermos a identidade da leishporina. Embora já tenhamos determinado várias características desta citolisina e do seu mecanismo de ação (Noronha et al., 1994; Noronha et al., 1996; Noronha et al., 2000; Almeida-Campos & Horta, 2000), não sabíamos sobre sua identidade molecular. Na busca dessa identidade, os resultados do presente trabalho utilizamos duas abordagens diferentes que, além de nos apontar para algumas moléculas candidatas a mediarem a atividade formadora de poros, elucidaram aspectos importantes sobre os requisitos necessários para que ocorra a lise. Assim, demonstramos que a leishporina se liga às membranas alvo e são removidas do extrato por hemácias ou lipossomos compostos de DPPC. Demonstramos ainda que o sítio de ligação da citolisina e o requisito mínimo para sua atuação são fosfolipídeos das membranas-alvo. Quanto à identificação da leishporina, utilizando técnicas de cromatografia, obtivemos várias frações líticas de extratos ricos em membrana de promastigotas, onde se localiza a leishporina. Algumas delas possuíam apenas lisofosfolipídeos e em outras, havia também proteínas, sendo que uma delas foi identificada como a HSP70 de *L. amazonensis*. A ligação seletiva da leishporina em lipossomos de DPPC também apontou para algumas proteínas como candidatas, sendo que uma delas, de PM por volta de 48 kDa, possivelmente a gp46 que sabidamente se ligou aos lipossomos. Outras proteínas que se ligaram aos lipossomos foram: a gp63, a beta-tubulina, a GAPDH, e

uma de 80 kDa, ainda não identificada. A termolabilidade do extrato total, em contraposição à termoresistência dos lisofosfolídeos bem como a termoresistência do extrato tratado com proteinase K, nos fez hipotetizar que a leishporina seja um complexo lipoprotéico cuja parte lipídica seria a responsável pela atividade formadora de poros e a parte protéica possa ser algumas das proteínas já identificadas ou apenas seu inibidor. Além disso, pela primeira vez, fomos capazes de visualizar, por Microscopia de Força Atômica, estruturas *pore-like* na superfície de hemácias e de filmes lipídicos derivados de lipossomos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) lisados pela leishporina.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABS** – Absorbância.

**AFM** – Atomic-Force Microscopy.

**ATV** – Atividade Hemolítica.

**Bis-acrilamida** – *N, N'*- metileno-bis-acrilamida.

**CHAPS** – (3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamonio]-1propano-sulfonato).

**DOPC** – Dioleilfosfatidilcolina.

**DPPC** – Dipalmitoilfosfatidilcolina.

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético.

**Ext-ms** – Extrato solubilizado da fração de membranas do parasito.

**Ext-pK** ou Ext-ms-pK – Ext-ms tratado com proteinase K.

**FPLC** – Fast Protein Liquid Chromatography.

**GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

**g-HCL** – Cloreto de Guanidina.

**HPLC** – High Performance/Pressure Liquide Chromatography.

**Hrs** – Horas.

**HuRBC** – Hemácias humanas.

**kDa** – quiloDalton.

**Lip** – Lipossomos.

**LPC** – Lisofosfatidilcolina – Lisofosfolípídeo – Lisofosfolípídeo de colina.

**M/Z** – Razão Massa/Carga.

**mA** – miliAmpère.

**MALDI – TOF** – Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight.

**PBS** – Solução salina tamponada com sulfato.

**PFP** – Peptídeo (ou proteína) formador(a) de poros.

**PM** – Peso molecular.

**PMSF** – Fluoreto de fenilmetilsulfonida.

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio.

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.

**SMF** – Sistema monocítico fagocitário.

**TFA** – Ácido trifluoracético.

**V** – Unidade de tensão.

**Vert distance** – Distância Vertical – Medida de Profundidade em AFM.

**ZIP-TIP** – Sistema de concentração e dessalinização de amostras em ponteiros com resina C18.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i></b>	<b>2</b>
<b>Figura 2 – Atividade hemolítica de extrato rico em membranas (Ext-ms) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3 – Dissociation of the membrane binding and lytic activities of leishporin.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4 – Remoção da atividade hemolítica de Ext-ms por hemácias e lipossomos.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5 – Efeito do colesterol da composição de lipossomos de DPPC sobre a sua capacidade de remover a atividade hemolítica de Ext-ms.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 6 – Efeito de DPPC e colesterol sobre a atividade lítica de Ext-ms.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7 – Efeito do colesterol na composição de lipossomos sobre sua susceptibilidade à lise.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 8 – Efeito da temperatura na lise de lipossomos.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 9 – Remoção da atividade lipolítica Ext-ms por lipossomos.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 10 – Lise de lipossomos por contato com lipossomos que removeram a atividade hemolítica de Ext-ms.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 11 – Efeito de PMSF na ativação da leishporina.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 12 – Ativação da leishporina em Ext-ms que teve atividade hemolítica removida por lipossomos.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 13 – Determinação da forma (ativa/inativa) da leishporina capaz de se ligar às membranas.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 14A – Esquema Experimental - Cinética de ligação da leishporina ativa e inativa na superfície de hemácias.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 14B– Cinética de Ligação da leishporina ativa e inativa.</b>	<b>48</b>

<b>Figura 15 – Análise por AFM de hemácias lisadas por Ext-ms.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 16 – Análise por AFM de filmes lipídicos de lipossomos de DPPC (susceptíveis à lise) ou de DOPC (não susceptíveis à lise) incubados com Ext-ms.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17 – Análise por AFM de filmes lipídicos de lipossomos de DPPC incubados com Ext-ms recém preparados ou desnaturados pelo calor.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 18 – Análise por AFM de filmes lipídicos de lipossomos de DPPC lisados por Ext-ms (análise em maior aumento do filme lipídico do experimento anterior (vide escalas).</b>	<b>53</b>
<b>Figura 19 – Perfil eletroforético e identificação das proteínas co-removidas com a atividade hemolítica de Ext-ms pelos lipossomos.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 20 – Cromatografia de Troca Iônica (Resource-Q).</b>	<b>58</b>
<b>Figura 21 – Cromatografia de Filtração Molecular / Superose 12 - Pico 1</b>	<b>59</b>
<b>Figura 22 – Cromatografia de Filtração Molecular / Superose 12 - Pico 2</b>	<b>60</b>
<b>Figura 23 – Cromatografia de Filtração Molecular / Superose 12 - Pico 3</b>	<b>61</b>
<b>Figura 24 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 1.</b>	<b>62</b>
<b>Figura 25 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 2.A.</b>	<b>63</b>
<b>Figura 26 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 2.B.</b>	<b>64</b>
<b>Figura 27 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 3.A.</b>	<b>65</b>
<b>Figura 28 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 3.B.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 29 – SDS – PAGE – Eletroforeses das frações líticas ao final do processo de purificação.</b>	<b>68</b>

<b>Figura 30 – Inibição da hemólise por DPPC e remoção da atividade hemolítica por lipossomos de DPPC da fração F1.3 proveniente da cromatografia de fase reversa.</b>	<b>69</b>
<b>Figura 31 – Identificação da proteína de 60 kDa presente na fração F1 .3 (Fig. 30)por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).</b>	<b>71</b>
<b>Figura 32 – Análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da fração F2-A-5 proveniente da cromatografia de fase reversa do experimento anterior (Fig. 30).</b>	<b>72</b>
<b>Figura 33 – Efeito da Proteinase K sobre a atividade lítica de Ext-ms – hemácias.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 34 – Efeito da proteinase-K sobre a atividade lítica de Ext-ms – lipossomos.</b>	<b>75</b>
<b>Figura 35 – Sensibilidade de Ext-ms digerido por Proteinase K à desnaturação pelo calor e ao tratamento de incubação com lipossomos.</b>	<b>76</b>
<b>Figura 36 – SDS-PAGE de Ext-ms digeridos por Proteinase K.</b>	<b>77</b>
<b>Figura 37 – Cromatografia de Fase-Reversa de Ext-ms tratado com 100 µg/mL de proteinase-K.</b>	<b>78</b>
<b>Tabela 3 – Análise das massas das moléculas líticas em cada uma das seis frações hemolíticas obtidas após a cromatografia de fase reversa do extrato de <i>L.amazonensis</i> tratado com 100 µg/mL de proteinase-K por 12 horas.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 38 – Cromatografia de Filtração Molecular na Presença de g-HCl/ Superose 12 - Ext-ms.</b>	<b>81</b>
<b>Figura 39 – Cromatografia de Troca Iônica (Resource-Q) Fração Ativa da Filtração Molecular.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 40 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C8 – Fração ativa</b>	<b>83</b>

<b>vinda da Troca Iônica.</b>	
<b>Figura 41 – Detecção por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica presente nas frações vindas da cromatografia de fase-reversa anterior ( Espectro representativo das frações F 1 e F3 dos respectivos picos).</b>	<b>85</b>
<b>Figura 42 – Detecção por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica presente nas frações vindas da cromatografia de fase-reversa anterior ( Espectro representativo da fração F 2 do respectivo pico).</b>	<b>86</b>
<b>Figura 43 – Identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica de M/Z 520 obtida após a cromatografia de fase-reversa.</b>	<b>87</b>
<b>Figura 44 – Identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica de M/Z 518 obtida após a cromatografia de fase-reversa.</b>	<b>88</b>
<b>Figura 45 – Efeito da fervura ou da incubação com lipossomos de DPPC sobre as lisofosfatidilcolinas líticas purificadas.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 46 – Modelos de Ativação e Dissociação da Citolisina e de suas Formas Ativas e Inativas.</b>	<b>104</b>

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1-O protozoário do gênero <i>Leishmania</i> : patogênese e ciclo de vida.	1
1.2-A leishporina - características gerais e interação com a bicamada lipídica .	4
1.3-Localização, mecanismo de lise e ativação.	5
1.4-Interação com membranas lipídicas artificiais (lipossomos).	5
1.5-Moléculas formadoras de poros - definição e aspectos gerais da interação com a bicamada lipídica e dos mecanismos de lise .	6
1.5.1-Definição – Funções – Ocorrência nos diferentes organismos.	6
1.5.2-Ligação, formação e estrutura dos poros.	7
1.5.3-Ativação de precursores inativos.	9
1.5.4-Compostos não protéicos com atividade formadora de poros.	11
1.6-Proteínas e peptídeos formadores de poros em protozoários patogênicos .	11
1.7-Justificativa, objetivos e abordagens.	14
<b>2-MATERIAL E MÉTODOS</b>	16
2.1-Cultivo e estoque de promastigotas.	16
2.2- Preparo dos extratos.	16
2.3-Determinação da atividade hemolítica.	17
2.3.1-Padronização de hemácias.	17
2.3.2-Ensaio hemolíticos.	17
2.3.3-Ensaio de inibição da atividade lítica por DPPC e Colesterol.	18
2.3.4-Ensaio de geração de atividade hemolítica.	19
2.3.5-Preparo de lipossomos unilamelares .	19

2.3.6-Remoção da atividade lítica por hemácias ou lipossomos .	20
2.4-Determinação da lise de lipossomos .	21
2.5-Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).	22
2.6-Tripsinização de proteínas <i>in situ</i> , eluição de peptídeos trípticos e análises de espectrometria de massa.	22
2.7-Cromatografias.	23
2.8-Microscopia de Força Atômica.	25
2.8.1-Membranas de hemácias.	25
2.8.2-Filmes lipídicos obtidos com lipossomos.	25
<b>3-RESULTADOS</b>	27
3.1-Atividade hemolítica de extratos ricos em membrana de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (Ext-ms).	27
3.2-Characterização da ligação da leishporina em células-alvo.	27
3.2.1 -Remoção da atividade hemolítica de Ext-ms por hemácias ou lipossomos .	27
3.2.2- Efeito do tratamento com colesterol ou DPPC na atividade hemolítica do Ext-ms.	33
3.2.3- Lise de lipossomos por Ext-ms.	33
3.2.4- Efeito da temperatura na atividade lítica de Ext-ms e no processo de lise de lipossomos.	36
3.2.5- Remoção da atividade lipolítica de Ext-ms por lipossomos.	36
3.2.6- Lise de lipossomos mediada por lipossomos que removeram a atividade hemolítica de Ext-ms.	39
3.3- Análise dos efeitos da ativação da leishporina .	39
3.3.1- Ativação proteolítica da leishporina por serino-proteases do Ext-ms .	41
3.3.2- Determinação da forma da leishporina ativa/inativa capaz de se ligar a DPPC.	44

3.3.3- Diferenças na cinética de ligação a lipídeos entre as formas ativas e inativas da leishporina.	44
3.4- Análise das membranas lisadas pela leishporina por microscopia de força atômica (MFA).	46
3.4.1- Visualização de estruturas pore-like na superfície de hemácias e lipossomos .	46
3.5-Purificação da leishporina a partir de Ext-ms .	55
3.5.1- Por remoção seletiva das moléculas co-removidas com a atividade lítica por lipossomos.	55
3.5.1.1-Análise das moléculas de Ext-ms co-removidas com a atividade hemolítica por lipossomos.	55
3.5.1.2-Identificação por espectrometria de massas das proteínas co-removidas com a atividade hemolítica de Ext-ms por lipossomos.	55
3.5.1.3- Perfil eletroforético de proteínas que se ligaram aos lipossomos após a re-ativação de Ext-ms hemoliticamente inativo.	57
3.5.2- Por cromatografia líquida em FPLC e HPLC.	57
3.5.2.1- Cromatografias utilizando Ext-ms.	57
3.5.2.2- Identificação da proteína de 60 kDa purificada por cromatografia na região e co-removida por lipossomos.	70
3.5.2.3- Análise das frações líticas obtidas ao final da cromatografia de fase reversa.	70
3.5.2.4- Cromatografias utilizando Ext-ms tratado com proteinase K.	70
3.5.2.5- Cromatografias utilizando Ext-ms tratado com g-HCl.	80
<b>4-DISCUSSÃO</b>	90
<b>5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	106



# 1-INTRODUÇÃO

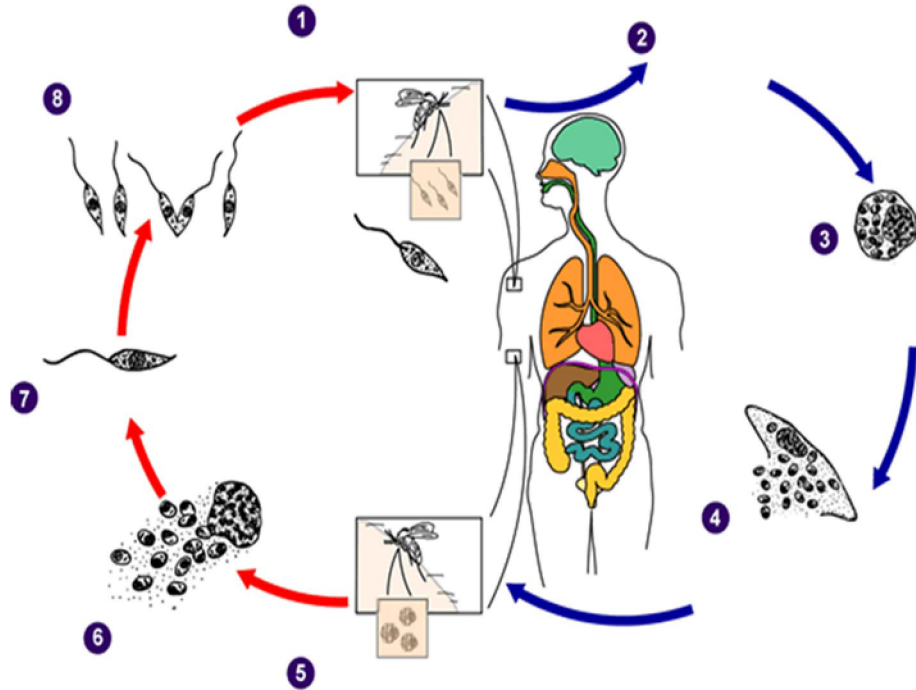
## 1.1-O protozoário do gênero *Leishmania*: patogênese e ciclo de vida.

O gênero *Leishmania* pertence ao grupo de zooflagelados da Ordem Kinetoplastida que são caracterizados pela presença de uma massa de DNA evidente, o cinetoplasto, localizada no interior de uma mitocôndria grande. Dos cinetoplastídeos, os pertencentes à Família Trypanosomatidae são parasitas intestinais de insetos e parasitos intra ou extracelulares de vertebrados, podendo nestes se desenvolver no interior de células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), no caso do gênero *Leishmania*, ou ainda viver no interstício como observado em certas espécies do gênero *Trypanosoma* (Ruppert & Barnes). Os tripanosomatídeos possuem um flagelo único que emerge da região próxima ao cinetoplasto.

Agentes causadores das leishmanioses, as espécies de *Leishmania* são diversas. Devido a controvérsias com relação à classificação, Lainson & Shaw, em 1987, propuseram uma divisão em dois sub-gêneros, *Leishmania* e *Viannia*, baseada principalmente no local de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e no desenvolvimento do protozoário na pele de hamsters e em meio de cultura. Assim sendo, no sub-gênero *Viannia* encontram-se as espécies do complexo chamado *braziliensis* causadoras das leishmanioses cutânea e mucocutânea no Novo Mundo, sendo exemplos a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) brasiliensis*. O outro sub-gênero, chamado *Leishmania* inclui as espécies do complexo *donovani* como a *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* responsáveis pela leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo, nesta ordem. No sub-gênero *Leishmania* ainda encontram-se as espécies do complexo *mexicana*, representado pelas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* causadoras da leishmaniose cutânea e cutânea difusa do Novo Mundo (Grimaldi & Tesh 1993; Lainson & Shaw, 1987).

A leishmaniose é uma doença que apresenta amplo espectro de quadros clínicos, que podem variar de lesões cutâneas até lesões internas que podem comprometer o funcionamento de órgãos, podendo, inclusive, levar à morte. A gravidade da infecção varia de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e depende também da resposta imune do hospedeiro e da patogenicidade do parasita.

O ciclo de vida da *Leishmania spp* (Fig. 1) é do tipo heteroxeno, no qual um inseto flebotomíneo hematófago fêmea do Gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo) ou



Adaptado de:

[www.med.sc.edu:85/parasitology/Leishmania-lc.gif](http://www.med.sc.edu:85/parasitology/Leishmania-lc.gif)

**Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp.** - As etapas representadas no esquema acima são as seguintes: 1) promastigotas no inseto; 2) inoculação de promastigotas; 3) multiplicação de amastigotas no interior do macrófago; 4) rompimento do macrófago; 5) ingestão de células infectadas; 6) liberação de amastigotas; 7) transformação em promastigotas; 8) multiplicação das promastigotas.

*Phlebotomus* (no Velho Mundo) pica um mamífero parasitado pelo protozoário e ingere, no momento do repasto, células infectadas pelas formas amastigotas. Os parasitos ingeridos, ainda que pouco numerosos, passam da forma amastigota para promastigota, a qual é capaz de se multiplicar extraordinariamente por divisão binária no intestino do inseto.

Existem duas teorias que tentam explicar o mecanismo de contágio do hospedeiro vertebrado. A primeira presume que as formas promastigotas metacíclicas (mais alongadas e extremamente infectantes) migram para a glândula salivar do inseto e são inoculadas junto com a saliva que é liberada no local da picada. A segunda entende que a multiplicação de promastigotas é tão grande que chega a formar êmbolos de parasitos no proventrículo intestinal do inseto, o que impede o repasto sanguíneo. Deste modo, o inseto regurgitaria esse agregado de promastigotas as quais seriam então fagocitadas pelas células do SFM dando continuidade ao ciclo.

No interior do hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas passam ainda por modificações morfológicas e bioquímicas antes de se tornarem infectantes. Esse conjunto de transformações é conhecido como metaciclogênese.

Os mecanismos de penetração das promastigotas metacíclicas na célula fagocitária continuam objeto de controvérsia, podendo envolver uma série de moléculas, mecanismos de facilitação da fagocitose e até penetração ativa. Uma vez interiorizado no macrófago, o parasita vive em um compartimento membranosos chamado vacúolo parasitóforo, formado após a fusão de lisossomos com o vacúolo fagocítico. É no interior desse vacúolo, de pH ácido e contendo diversas proteases, que se dá a diferenciação das formas promastigotas para as formas amastigotas, as quais se reproduzem e, eventualmente, rompem a membrana do vacúolo parasitóforo e do próprio macrófago. Ganhando o interstício, as amastigotas são fagocitadas por outras células, amplificando a infecção. Não se sabe ao certo como ocorre a etapa de ruptura do vacúolo parasitóforo e do macrófago. Em geral, assume-se, baseado em evidências visuais, que a replicação irrestrita das amastigotas é a causa direta da ruptura celular (Wilson & Pearson, 1990; Liew & O'Donnell, 1993; Bray, 1987 e Handman, 1999). Também por evidências visuais, é sugerido ainda que as amastigotas sejam liberadas por exocitose, com discreta contração da membrana, mas sem ruptura celular (Rittig & Bogdan, 2000).

## **1.2-A leishporina - características gerais e interação com a bicamada lipídica.**

Em trabalhos anteriores, nosso grupo descreveu uma atividade hemolítica em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* que danifica a membrana de macrófagos por formar poros transmembranas (Noronha et al., 1994; Noronha et al., 1996; Noronha et al., 2000 e Horta, 1997). Uma vez que a atividade citolítica do extrato é sensível ao calor e ao tratamento com tripsina, caracterizamos essa citolisina como uma proteína formadora de poros e a nomeamos leishporina (Noronha et al., 2000; Horta, 1997).

A leishporina foi inicialmente caracterizada em *L. amazonensis*, espécie causadora da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo. No entanto, a atividade hemolítica da leishporina, embora em níveis e formas diferentes, também foi mostrada em promastigotas de *L. major*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Noronha et al., 1996). Uma característica interessante da leishporina é que ela possui atividade ótima em pH ácido de 5,5 e na temperatura de 37°C, mas também é lítica em temperaturas mais baixas de 25°C e em pH neutro. Devido à sua atividade ótima, ela pode agir com toda a potência no interior do fagolisossomo de macrófagos, cujo pH é ácido (Burchmore & Barrett, 2001) e, assim, postulamos que ela possa estar envolvida na liberação das amastigotas pelo rompimento da célula hospedeira (Noronha et al., 1994; Noronha et al., 1996; Horta, 1997; Almeida-Campos et al., 2002). Esta função foi demonstrada para citolisinas de bactérias como *Legionella pneumophila* (Gao & Kwaik, 2000; Molmeret & Kwaik, 2002) e *Listeria monocytogenes* (Schnupf & Portnoy, 2007) e já foi sugerida para uma citolisina de *T. cruzi*, a Tc-Tox (Andrews & Whitlow, 1989; Ley et al., 1990; Andrews et al., 1990). Contudo, outras possibilidades de atuação da citolisina de *Leishmania* podem ser também: a indução de influxo de íons cálcio, aumentando e provocando a fagocitose pelos macrófagos no momento da invasão da célula hospedeira; a indução de vias apoptóticas no parasita que levariam a morte da célula infectada e sua captação por outros macrófagos que seriam assim infectados; formação de canais na membrana do vacúolo parasitóforo permitindo a captação de nutrientes do citoplasma; ou a ruptura das hemácias digeridas pelo inseto vetor pelas promastigotas permitindo a captação de nutrientes dessas células.

### **1.3-Localização, mecanismo de lise e ativação.**

Em promastigotas de *L. amazonensis*, a espécie mais estudada pelo nosso grupo, a leishporina está presente na fração de membranas do parasito, provavelmente no interior de vesículas membranosas (Noronha et al., 1996). Embora não saibamos se esta citolisina é liberada, resultados preliminares mostram que ela pode ser secretada. A lise mediada pela leishporina ocorre em pelo menos duas etapas distintas, nesta ordem, como demonstrado em hemácias: 1) ligação da citolisina à membrana da célula-alvo, etapa independente da temperatura, ocorrendo mesmo a 0 °C; 2) lise, propriamente dita, que só ocorre em temperaturas mais altas e cuja temperatura ótima de ação é 37 °C (Noronha et al., 1994; Noronha et al., 1996; Castro-Gomes et al., 2009). Resultados anteriores, mostrando que os poros formados aumentam de tamanho com o tempo e com o aumento da concentração de leishporina, sugerem que esta etapa pode ser a de inserção e polimerização de monômeros na membrana-alvo (Noronha et al., 2000). Foi ainda mostrado que, para lisar hemácias, a leishporina precisa ser ativada. Há evidências de que esta ativação ocorre pela remoção de um oligopeptídeo inibidor o que pode ser alcançado tanto por agentes dissociantes como por proteases endógenas ou exógenas. Resultados anteriores ainda sugerem que tanto a forma ativa como a forma inativa podem se ligar à membrana da célula-alvo. No entanto, a lise só ocorre após sua ativação (Almeida-Campos & Horta, 2000; Almeida-Campos, 2001).

### **1.4-Interação com membranas lipídicas artificiais (lipossomos).**

Foi demonstrado que lipossomos multilamelares (Almeida-Campos, 2001) ou unilamelares (Castro-Gomes et al., 2009; Almeida-Campos et al., 2010) compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e colesterol são capazes de remover a atividade lítica dos extratos de *L. amazonensis*, o que nos indicou que a leishporina poderia ligar-se diretamente a esses lipídeos. Foi ainda mostrado que o extrato hemoliticamente inativo após a remoção da atividade ainda pode ser ativado por proteases ou agentes dissociantes sendo que essa nova atividade também pode ser removida pelos lipossomos, sugerindo que formas inativas da leishporina presentes no extrato, ou estão em maior quantidade ou não se ligam eficientemente aos lipossomos e que a ativação da leishporina possivelmente expõe em sua molécula sítios de ligação a lipídeos.

## **1.5-Moléculas formadoras de poros - definição e aspectos gerais da interação com a bicamada lipídica e dos mecanismos de lise.**

### **1.5.1-Definição – Funções – Ocorrência nos diferentes organismos.**

As moléculas formadoras de poros mais conhecidas são proteínas ou peptídeos. No entanto, algumas classes de lipídeos são capazes de formar poros detectáveis por *patch-clamp* em membranas celulares mimetizando a ação de proteínas formadoras de poro clássicas (Wilson-Ashworth et al., 2004). Essas moléculas interagem com a bicamada lipídica formando canais transmembrana que permitem a passagem de íons e de moléculas pequenas. Proteínas formadoras de poros (PFPs) estão envolvidas em alguns processos biológicos importantes como comunicação celular, lise e apoptose e são recorrentes em vários organismos desde vírus, bactérias e protozoários até os vertebrados (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1988; Ludwig, 1996; Ojcius & Young, 1990; Horta, 1997; Zitzer et al., 1997; Almeida-Campos et al., 2002). PFPs estão presentes na composição de vários venenos e toxinas, no sistema imune de vários organismos, sendo também produzidas por vários patógenos intra e extracelulares. Atualmente há cerca de 300 PFPs descritas e, dentre essas, estima-se que um terço aja rompendo membranas (Parker & Feil, 2005), contudo, várias outras funções têm sido atribuídas a essas moléculas (Almeida-Campos et al., 2002).

Sob este aspecto, as PFPs podem, de modo geral, ser reunidas em alguns grupos principais. Há PFPs cujas funções estão relacionadas à defesa contra patógenos ou agressores. Fazem parte desse grupo a perforina de linfócitos T citotóxicos e células NK e o componente C9 do sistema do complemento presente no sistema imune dos mamíferos, os cnidoporos dos cnidários, as PFPs que integram a composição de alguns venenos de insetos e aracnídeos e as PFPs de anelídeos e de alguns vegetais do gênero *Passiflora* (Yuldasheva et al., 2005). Há ainda PFPs com funções possivelmente relacionadas à alimentação, entre as quais podemos citar como exemplo o amebaporo de *Entamoeba histolytica*, protozoário patogênico causador da amebíase humana, já que essas proteínas parecem ajudar na digestão de bactérias que são a principal fonte alimentar deste protozoário (Leippe, 1997; Andrä et al., 2004), e as PFPs encontradas em salivas de alguns insetos hematófagos como *Triatoma infestans* (Amino et al., 2002)

que parecem estar envolvidas na digestão das células ingeridas por estes insetos ou que podem ainda atuar no momento do repasto facilitando o aporte de sangue.

PFPs podem ainda ser uma arma para assegurar a competitividade, o bom desempenho e o sucesso de um organismo ao explorar seu nicho. Alguns organismos parecem utilizá-las para impedir a aproximação ou crescimento de competidores ou para evadir de um determinado local e explorar outro quando o meio se torna hostil ou saturado. Neste grupo podemos citar as PFPs produzidas por algumas bactérias intracelulares dos gêneros *Legionella*, *Yersinia*, *Listeria* e *Neisseria* (revisado por Almeida-Campos et al., 2002) que parecem facilitar a sobrevivência desses organismos ao induzir a entrada na célula hospedeira ou seu escape desta, possibilitando a evasão dos mecanismos de defesa de seus hospedeiros. Nesse sentido a listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* apresenta-se como um exemplo clássico. Já foi demonstrado que essa proteína tem um papel central no ciclo de vida intracelular dessa bactéria (Schnupf & Portnoy, 2007), sendo responsável pela ruptura do fagolisossomo, etapa fundamental da infecção que libera a bactéria para o citosol, local onde ocorre sua replicação. A criação de canais transmembrana em vacúolos parasitóforos, possibilitando a captura de micronutrientes pelos parasitas que vivem nesses compartimentos, é outra interessante função que vem sido atribuída à PFPs. PFPs podem ainda induzir a célula hospedeira a entrar em apoptose matando-a como verificado em infecções por *Salmonella* e *Shigella*, possivelmente possibilitando que a bactéria invada outra célula quando há escassez de nutrientes (Lundberg et al., 1999; revisado por Almeida-Campos et al., 2002).

### **1.5.2-Ligação, formação e estrutura dos poros.**

O mecanismo de formação de poros na membrana-alvo ocorre de modo geral em três etapas, não necessariamente nessa ordem: 1- ligação de monômeros na membrana-alvo; 2- oligomerização; 3- inserção do poro (revisado por Parker et al., 2005). O tamanho do poro, bem como sua seletividade e estrutura variam de acordo com a PFP. Do ponto de vista estrutural as PFPs podem ser reunidas em dois grupos: os da  $\alpha$ -PFPs e os da  $\beta$ -PFPs, sendo que as primeiras formam poros compostos de uma grande quantidade de hélices transmembranas e as segundas são conhecidas por tenderem a possuir uma grande quantidade de folhas beta e seus poros geralmente seguem o padrão estrutural do tipo  $\beta$ -barril. São exemplos de  $\alpha$ -PFPs as colicinas de *E. coli*, as proteínas apoptóticas

da família Bcl-2 e a equinatoxina da anêmona *Actinia equina*. No grupo das  $\beta$ -PFPs podemos citar a aerolisina, toxina produzida por bactérias gram-negativas do gênero *Aeromonas*, a  $\alpha$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, a toxina antraz de *Bacillus anthracis* e a perfringolisina de *Clostridium perfringens* (Gouaux, 1997; Parker & Feil, 2005).

Com o avanço dos estudos das PFPs, principalmente no que se refere à purificação, sequenciamento, clonagem e cristalografia dessas proteínas muito vem sendo descoberto acerca de como essas proteínas interagem com as bicamadas lipídicas. De um modo geral parece que a composição das membranas tem papel fundamental na ligação dessas proteínas e na formação de seus poros. Há PFPs que necessitam da presença de um receptor protéico na superfície de sua célula-alvo como a aerolisina de *Aeromonas hydrophila* e a toxina inseticida CryIIIA de *Bacillus thuringiensis*. Outras independem de proteínas, mas a composição lipídica da membrana muitas vezes parece ser fundamental para a sua ação (Parker & Feil, 2005). Há um consenso entre os pesquisadores ao agrupar as PFPs como dependentes e independentes do colesterol (Tweten, 2005). Para algumas citolisinas, o colesterol parece ser muito importante para a lise como é o caso da perfringolisina produzida por *Clostridium perfringens* (Nakamura et al., 1995; Heuck et al., 2000; Czajkowsky et al., 2004) e a pneumolisina produzida pela bactéria causadora de pneumonia e meningite humana *Streptococcus pneumoniae* (Tilley et al., 2005). A ligação dos monômeros dessas duas citolisinas à membrana alvo está diretamente associada a uma alça rica em triptofano que interage diretamente com o colesterol. Após a oligomerização forma-se uma estrutura em forma de anel, o pré-poro, que ao passar por mudanças conformacionais dependentes de temperatura sofre um colapso vertical e se insere na membrana permeabilizando-a. Ainda neste grupo, extratos de *Passiflora quadrangularis* apresentam atividade hemolítica que parece ser devida à presença de uma PFP e ensaios com lipossomos demonstraram que a ligação desta proteína a membranas não ocorre na ausência de colesterol (Yuldasheva et al., 2005). *Vibrio cholerae*, bactéria causadora do cólera, expressa uma PFP cuja capacidade de permeabilizar lipossomos é também dependente da presença de colesterol (Zitzer et al., 2000). O papel do colesterol para a lise é ainda alvo de muita discussão. Alguns autores acham que o colesterol é importante somente para a ligação dos monômeros, outros acreditam que o colesterol é preponderante no momento da inserção do poro e na lise propriamente dita (Tilley et al., 2005). Fato é que essas diferenças de interação variam de acordo com a citolisina e com suas respectivas membranas-alvo. É interessante notar



que muitas PFPs de bactérias patogênicas agem de modo dependente de colesterol. Para um procarionte, que não possui colesterol em suas membranas, produzir uma PFP dependente de colesterol pode ser um eficiente mecanismo de proteção contra a autólise e ao mesmo tempo um perfeito endereçamento dessas para células eucariontes. No grupo de PFPs que agem independentemente da presença de colesterol nas membranas de células-alvo, podemos citar a hemolisina *Shla* de *Serratia marcescens* (Hertle, 2002), as colicinas de *E. coli*, a equinatoxina de *Actinia eqüina* e a aerolisina produzida por algumas bactérias do gênero *Aeromonas* (Parker & Feil, 2005) e as PFPs de protozoários como os amebaporos e naegleriaporos produzidos pelas amebas *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri*, respectivamente (Andrä et al., 2004), entre outras.

### **1.5.3-Ativação de precursores inativos.**

Um aspecto interessante no mecanismo de ação das PFPs é que, para permeabilizar membranas, muitas vezes elas precisam ser ativadas como ocorre com a PFP da ameba de vida livre causadora de uma meningocefalite humana, *Naegleria fowleri*, (Herbst et al., 2004) e com PFPs de várias bactérias como a aerolisina de *Aeromonas hydrophila*. Essas PFPs são produzidas sob a forma de precursores inativos e podem ser ativadas e/ou potencializadas por digestão proteolítica. O processo de ativação pode envolver também uma etapa de remoção de um peptídeo inibidor como observado para a aerolisina de *Aeromonas hydrophila* ou processamento proteolítico sítio-específico como observado nas PFPs de *Naegleria fowleri* (Herbst et al., 2004). A  $\alpha$ -toxina de *Clostridium septicum* é também ativada por digestão proteolítica de um precursor inativo e, além disso, a ativação desta molécula só é completa após a remoção de um peptídeo inibidor (Ballard et al., 1993). Tais processos de ativação, possivelmente expõem nessas moléculas sítios hidrofóbicos que passam a interagir mais fortemente com as membranas alvo.

Proteínas citolíticas variam muito em relação ao tamanho nos diferentes organismos, podendo ser proteínas de alto peso molecular como as PFPs de algumas bactérias, formando grandes complexos protéicos partindo de monômeros de alto peso molecular, até peptídeos muito pequenos que apresentam atividade formadora de poros.

Os peptídeos antimicrobianos, AMPs, representam hoje um fértil campo de pesquisa, atuando como formadores de poros que desestabilizam as membranas de bactérias, apresentando também atividade hemolítica. São exemplos desses peptídeos a

melitina de *Apis mellifera* e alameticina do fungo *Trichoderma viride*. Como exemplos de peptídeos formadores de poros de protozoários, temos o naegleriaporo e amebaporo das amebas *Naegleria fowleri* e *Entamoeba histolytica*, respectivamente, que apresentam peso molecular em torno de 5 kDa. Em outros organismos, no entanto, podemos encontrar peptídeos formadores de poros bem menores como a piscidina, peptídeo formador de poros do sistema de imunidade inata de alguns peixes (Campagna et al., 2006) que apresentam 22 resíduos de aminoácidos e a temporina, um peptídeo citolítico de apenas 13 resíduos de aminoácidos da rã *Rana temporaria* que possui atividade hemolítica (Mangoni et al., 2005).

O fato de naegleriaporo e amebaporo serem ativadas por digestão proteolítica sugere que essas moléculas, uma vez ativas, sejam resistentes à proteólise. Esta hipótese parece plausível uma vez que, mesmo após o tratamento com proteinase K, os peptídeos derivados da  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus* continuam apresentando atividade lítica e, além disso, são mais resistentes aos processos desnaturantes do que as proteínas que os originaram (Palmer et al. 1993). Este mesmo processo de ativação e resistência à atividade proteolítica é observado para a toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* já que uma vez que atingem o trato digestivo dos insetos, sofre digestão por enzimas proteolíticas do próprio inseto, o que as torna ativas e capazes de matá-los logo em seguida (Haider et al. 1986).

No caso de parasitas intracelulares, que estão sob constante ataque de enzimas proteolíticas vindas do hospedeiro, ou mesmo das amebas parasitas do trato intestinal que vivem em um meio rico em proteases, a produção de moléculas citolíticas resistentes à proteólise torna-se um imperativo para que essas citolisinas consigam realizar as funções para as quais foram evolutivamente selecionadas. A leishporina de *L. amazonensis* é também um exemplo de citolisina que precisa ser ativada para formar poros (Almeida-Campos, 2001). Há evidências de que a citolisina inativa esteja ligada não covalentemente a um oligopeptídeo inibidor que pode ser removido tanto por agentes dissociantes quanto por proteólise (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010).

#### **1.5.4-Compostos não protéicos com atividade formadora de poros.**

Existem ainda relatos de uma série de compostos não protéicos com atividade de formação de poros confirmada. Um exemplo de molécula não protéica com capacidade de formar poros que mimetizam poros protéicos são os lisofosfolipídeos: moléculas anfipáticas geradas por ação da degradação dos fosfolipídeos. Estes compostos são intermediários metabólicos estáveis que podem levar entre outros à lise coloido-osmótica de hemácias, ao influxo de ions cálcio em células e à ruptura celular (Sarker et al., 2010, Zhou et al., 2006, Shimuta et al., 2009; Ogita et al., 1997). Estes compostos apresentam altíssima atividade lítica e os poros por eles produzidos podem ser detectados pelo ensaio de *patch-clamp* (Wilson-Ashworth et al., 2004). Lisofosfolipídeos foram ainda caracterizados como os mediadores da lise por contato provocada por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em eritrócitos incubados com o parasita (Luján & Bronia, 1994). Baseando-se nos no que foi encontrado pelos grupos acima citados é possível que a lise seja por formação de poros, embora isto não tenha sido demonstrado pelos autores. Outro exemplo de lipídeos catiônicos capazes de formar poros em biomembranas são os chamados BHHD-TADC and BHTD-TADC cujos poros são formados de maneira ótima em pH 6,5 (Chanturiya et al., 2003). Além disso compostos aromáticos como oligoamidas macrocíclicas, sais poliméricos de alquilpiridínio, compostos inorgânicos como o lantanídeo gadolínio (cujos poros foram inclusive demonstrados por microscopia de força atômica) e alguns glicofosfolipídeos, entre outros, tem sido reportados na literatura como apresentando atividade formadora de poro (Helsel et al., 2008; McClelland et al., 2003; Cheng et al., 1999; Pluzhnikov et al., 2006).

#### **1.6-Proteínas e peptídeos formadores de poros em protozoários patogênicos.**

Em protozoários patogênicos, as PFPs parecem exercer um papel importante na evasão e na sobrevivência dos parasitas dentro do hospedeiro, podendo ter implicações nas patologias provocadas por esses organismos (Horta, 1997; Almeida-Campos et al., 2002). *Entamoeba histolytica*, já mencionada anteriormente, além de utilizar os amebaporos para a digestão do conteúdo alimentar, pode também secretar essas

citolisinas (Young et al., 1982; M. Leippe, 1997; Hecht et al., 2004), que já foram descritas como sendo um importante fator de virulência para este parasita (Bracha et al., 2003). Dentre as PFPs de protozoários, as mais bem caracterizadas são os amebaporos. Trata-se de 3 isoformas de uma molécula com 77 resíduos de aminoácidos (Leippe et al., Hecht et al., 2004). Também como já mencionado, a naegleriaporo de *Naegleria fowleri*, molécula que também parece estar envolvida nos danos teciduais presentes na infecção, apresenta 3 isoformas de massas moleculares aparentes de 7, 10 e 13 kDa (Herbst et al., 2004). *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas, possui uma atividade lítica cujo mecanismo é por formação de poros. Essa atividade lítica foi atribuída a uma citolisina chamada Tc-TOX, e algumas evidências sugerem que possa estar envolvida no rompimento do vacúolo parasitóforo com conseqüente escape do parasita para o citoplasma. A Tc-TOX parece ter o peso molecular em torno de 70 kDa e apresenta similaridade antigênica com o C9 do sistema do complemento e com a perforina de camundongo (Andrews & Whitlow, 1989; Andrews, 1990; Andrews, 1994). Outros protozoários nos quais recentemente foi detectada a presença de uma família de genes que codificam proteínas com domínios semelhantes ao da *Família de Complexo de Ataque a Membranas e Perforina (MACPF-like domains)* foram o *Plasmodium falciparum*, um dos agentes causadores da malária humana e o *Toxoplasma gondii* agente causador da toxoplasmose humana (Kaiser et al., 2004; Ishino et al., 2005). Ficou demonstrado que as proteínas codificadas por esta família de genes se localizam nos micronemas dos esporozoítos (regiões secretórias importantes para a infecção) e que eram fundamentais para o sucesso de um dos passos cruciais da infecção por esses protozoários: a travessia do endotélio dos capilares sinusóides pelos esporozoítos com posterior infecção dos hepatócitos no caso de *P. falciparum* (Ishino et al., 2005) e na ruptura dos vacúolos e das células hospedeiras no caso de *T.gondii* (Kafsack et al., 2009). A tabela 1 resume as principais características de PFPs já descritas em protozoários.

**TABELA 1 - PFPs de Protozoários - Características e Funções.**

<b>Protozoário</b>	<b>PFP – Características</b>	<b>Função/Consequência</b>
<p><i>Entamoeba histolytica</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Young et al. (1982)</li> <li>. Hecht et al. (2004)</li> <li>. Leippe (1997)</li> <li>- Leippe et al. (1991)</li> </ul>	<p><b>amebaporo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. localizadas em vesículas citoplasmáticas</li> <li>. pH ótimo = ácido</li> <li>. ~ 5 kDa</li> <li>. tamanho do poro = 2 nm</li> </ul>	<p>Citólise mediada por contato</p> <p>Lesão tecidual</p> <p>Alimentação (?)</p> <p>Defesa (?)</p>
<p><i>Naegleria fowleri</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Young &amp; Lowrey (1989)</li> <li>. Herbst et al. (2004)</li> </ul>	<p><b>naegleriaporo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. 10-13 kDa</li> <li>. termorresistente</li> <li>. pH ótimo = ácido</li> <li>. associada à membrana</li> </ul>	<p>Citólise</p> <p>Meningo-encefalite com alto grau de lesão tecidual</p> <p>Alimentação (?)</p> <p>Defesa (?)</p>
<p><i>Trypanosoma cruzi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Andrews (1990)</li> <li>. Andrews (1994)</li> <li>. Manning-Cela et al. (2001)</li> </ul>	<p><b>Tc-TOX/LYT1 (?)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. ~ 70 kDa</li> <li>. antigenicamente homóloga ao C9</li> <li>. secretada por amastigotas</li> <li>. pH ótimo = ácido (inativa em pH neutro)</li> <li>. tamanho do poro = ~ 10 nm</li> </ul>	<p>Evasão do fagolisossoma – persistência do parasita dentro da célula (?)</p>
<p><i>Leishmania amazonensis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Noronha et al. (1994)</li> <li>. Noronha et al. (1996)</li> <li>. Horta (1997)</li> <li>. Noronha <i>et al.</i> (2000)</li> <li>. Almeida-Campos &amp; Horta (2000)</li> <li>. Almeida-Campos <i>et al.</i> (2002)</li> </ul>	<p><b>leishporina</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. termolábil</li> <li>. secretada por promastigotas (?)</li> <li>. antigenicamente similar ao C8 e ao C9</li> <li>. pH ótimo = ácido (5,5)</li> <li>. temperatura ótima = 37 °C</li> <li>. tamanho do poro = variável</li> <li>. precisa ser ativada</li> </ul>	<p>Ruptura do macrófago – lesão tecidual e amplificação da infecção (?)</p>
<p><i>Plasmodium falciparum</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Kaiser et al. (2004)</li> <li>. Ishino et al. (2005)</li> <li>. Ecker et al. (2007)</li> </ul>	<p><b>Pf-MACPF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. encontrada nos micronemas</li> <li>. similar às proteínas do complexo de ataque a membranas e perforina (MACPF)</li> </ul>	<p>Travessia do endotélio.</p> <p>Infecção do intestino do mosquito vetor.</p>
<p><i>Toxoplasma gondii</i></p> <p>Kafsack et al. (2009)</p>	<p><b>Tg-PLP</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. encontrada nos micronemas</li> <li>. similar a MACPF.</li> </ul>	<p>Ruptura do fagolisossomo e da célula hospedeira.</p>

## 1.7-Justificativa, objetivos e abordagens.

A leishmaniose, a malária, a amebíase e a doença de Chagas, moléstias da mais alta importância em saúde pública, são responsáveis pela morte e invalidez de milhões de pessoas a cada ano e sobrecarregam os serviços de saúde pública, na maioria das vezes ineficazes. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia destes organismos pode oferecer informações preciosas para a descoberta de alvos para tratamento. As citolisinas formadoras de poros podem ser moléculas fundamentais que podem permitir a esses organismos a invasão de células e tecidos, a evasão dos mecanismos antimicrobianos e o escape aos mecanismos imunológicos.

A presença de uma citolisina formadora de poros no gênero *Leishmania* instiga-nos em vários aspectos. O primeiro deles refere-se à sua função. É nosso objetivo, em médio prazo, determinar a função da leishporina no ciclo vital do parasita. A busca da função remete-nos a um aspecto adjacente, que se refere ao seu envolvimento na patogenicidade do parasita. Por ser uma molécula formadora de poros é bem possível que, como outras de funções conhecidas, ela seja um fator de virulência para o parasita. Por suas características de ter atividade ótima em pH ácido e a 37 °C, uma de nossas hipóteses é que a leishporina possa estar envolvida no rompimento do macrófago, com liberação de novas amastigotas infectantes, o que seria um elemento de amplificação da infecção, etapa do ciclo até hoje pouco compreendida. Outro aspecto refere-se ao seu mecanismo de ação. Já temos alguns dados sobre o seu modo de ação, mas vários outros requerem investigação. O estudo e a compreensão de seus mecanismos de atuação são particularmente interessantes, já que podem dar pistas importantes a respeito dos mecanismos de infecção e da patogenia do parasita. Um aspecto mais geral, mas também importante é que citolisinas formadoras de poros vêm sendo muito estudadas por suas ações tumorocidas e antimicrobianas. Um maior conhecimento sobre a leishporina, o estudo de sua estrutura e a compreensão de seu mecanismo de ação poderão ser importantes para eventual aplicação desse conhecimento. Outro aspecto que nos instigava era que, nosso grupo já havia demonstrado por *patch clamp*, que a citólise mediada pela leishporina é por formação de poros. No entanto, até o momento não havia sido possível visualizar essas estruturas na membrana lisada.

Praticamente toda a caracterização da leishporina, incluindo os resultados deste trabalho, tem sido feita em frações de promastigotas ricas em membranas, onde se localiza a leishporina. Um estudo mais detalhado da citolisina e de sua função na biologia do protozoário depende diretamente de sua identificação molecular e da determinação de sua seqüência de aminoácidos. Isto que possibilitará a caracterização de sua molécula, e desenhar estratégias para seu posterior estudo funcional. Assim, o objetivo primário deste trabalho foi o de purificar a(s) molécula(s) que chamamos leishporina. O fato de ela se ligar a membranas celulares nos fez tentar inicialmente obter a(s) molécula(s) pura(s) ou semi-pura(s) utilizando membranas artificiais como lipossomos para a sua captura seletiva. Durante nosso trabalho com os lipossomos, várias perguntas foram sentas colocadas e vários aspectos sobre a interação da leishporina com membranas biológicas e sobre a formação de poros foram sendo esclarecidos, os quais também fazem parte deste trabalho. Além disso, utilizamos o método convencional de purificação por cromatografia líquida para purificarmos a leishporina.

De modo geral, seguimos os seguintes passos, não necessariamente na ordem que estão apresentados:

**1 – Caracterização da ligação da leishporina em células-alvo:**

- requisito mínimo para sua ligação à membrana para a lise da célula-alvo;
- demonstração de que entre as moléculas que se ligam a membranas e são co-removidas com a atividade lítica está a leishporina.

**2- Análises do efeito da ativação da leishporina**

- por dissociação
- por proteólise

**3 – Análises das membranas lisadas pela leishporina por Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy - AFM)**

- hemácias
- lipossomos

**4 – Purificação da leishporina a partir de extratos ricos em membranas de promastigotas:**

- por remoção seletiva das moléculas co-removidas com a atividade lítica por lipossomos.
- por cromatografia líquida em FPLC e HPLC.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Cultivo e estoque de promastigotas.

A espécie de leishmania utilizada neste trabalho foi a *L. amazonensis*, cepa PH8, código internacional IFLA/BR/67/PH8. As amostras preservadas em nitrogênio líquido eram descongeladas e inoculadas em meio de cultura Schneider (Sigma Chem. Co.) acrescido de 10 % v/v de soro fetal bovino. O crescimento dos parasitas era acompanhado ao microscópio invertido (Olympus IMT, Tóquio, Japão) para verificar a ausência de contaminação. Os parasitas utilizados eram colhidos preferencialmente no quinto dia de cultivo, onde alcançavam seu ponto máximo de crescimento e onde a atividade hemolítica é máxima (Noronha et al., 1996). A contagem das promastigotas era feita utilizando uma pequena alíquota retirada das garrafas de cultura. Essa alíquota era diluída num determinado volume de ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5 % v/v, pH 7,2), 10 µL dessa diluição eram então aplicados em câmara hematocimétrica de Neubauer (C. A. Hausser & Son, Philadelphia, USA) e a contagem das promastigotas era feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A média aritmética dos quatro quadrantes para contagem de leucócitos era obtida e multiplicada pelo inverso da diluição e novamente multiplicada por  $10^4$ , o fator de correção do volume da câmara. Ao final era obtido o número de parasitas por mL de cultura. O número máximo de passagens que as promastigotas foram submetidas foi dez, pois se sabe que quando mantidas em cultura *in vitro* por um longo tempo, esses parasitas perdem algumas de suas características, incluindo a virulência. Após serem lavadas cinco vezes com PBS, os parasitas eram guardados em alíquotas de  $1 \times 10^9$  parasitas e congeladas a  $-80$  °C.

### 2.2- Preparo dos extratos.

Alíquotas de  $2 \times 10^9$  promastigotas de *L. amazonensis* eram ressuspensas em tampão ácido bórico-NaOH 50 mM pH 7,0. Essa suspensão era então submetida a cinco ciclos de congelamento-descongelamento em  $N_2$  líquido e banho-maria 37 °C para rompimento dos parasitas. Esse extrato total era então submetido a uma centrifugação a 1000 g durante 5 minutos para sedimentação dos núcleos e parasitas íntegros. O



sobrenadante, o extrato total, era então transferido para outro tubo *Eppendorf* e centrifugado durante uma hora a 10.000 g para se obter uma fração rica em membranas. Em seguida o sobrenadante era desprezado o sedimento era ressuspensionado para o volume inicial, acrescido de 0,4 % de CHAPS ( $\{3-[(3\text{-colamidopropil})\text{-dimetil-amônio}]\text{-1-propanosulfato}\}$ ) (Sigma), concentração sub-lítica para as hemácias, e incubado por 1 hora a 4 °C com agitação ocasional. Depois desse tratamento, a fração de membranas solubilizada era novamente centrifugada a 10.000 g e o sobrenadante, o extrato da fração de membranas solubilizado (Ext-ms) era então utilizado em todos os experimentos. Os extratos utilizados para as cromatografias eram preparados na presença de um coquetel de inibidores de proteases (Proteasis Inhibitor Mix GE Health Care) e EDTA 20 mM, para a inibição das metaloproteases muito abundantes nesses parasitas.

## **2.3- Determinação da atividade hemolítica.**

### **2.3.1- Padronização de hemácias.**

Hemácias humanas eram colhidas e mantidas diluídas em solução preservativa de Alsever (glicose 100 mM, citrato de sódio 30 mM, NaCl 70 mM, pH 6,0) na proporção 1:3, onde ficavam guardadas a 4 °C por até três semanas. Antes de serem utilizadas em ensaios as hemácias eram lavadas três vezes com PBS. O número de células era determinado de modo indireto pela liberação da hemoglobina na lise em água. Após a última lavagem, 100 µL do sedimento de hemácias eram colocados em 900 µL de PBS e 100 µL dessa nova suspensão eram colocados em 1400 µL de água destilada para rompimento das células. O produto da lise era então lido a 545 nm e a densidade óptica era utilizada para determinar o número de hemácias, sabendo que 0,700 unidades de absorvância correspondem a  $1 \times 10^9$  hemácias.

### **2.3.2- Ensaios hemolíticos.**

A atividade hemolítica dos extratos ou frações era determinada fazendo-se a diluição em série (1:2) do mesmo em placa de micro-ensaio Nunc (Dinamarca). Após a diluição, 200 µL de tampão acetato (tampão acetato de sódio-ácido acético 20 mM, pH 5,5 com 150 mM de cloreto de sódio) contendo  $5 \times 10^6$  hemácias eram acrescentados em cada compartimento. Após incubação de 30 minutos a 37 °C a placa era então

centrifugada por 10 minutos a 500 g para sedimentar as hemácias não rompidas. A hemoglobina liberada no sobrenadante era lida em placa de fundo chato Nunc a 414 nm, em leitor de ELISA (Spectra Max, Molecular Devices). Para os cálculos de porcentagem de lise, a quantidade total de hemoglobina liberada era obtida provocando-se a lise da mesma quantidade de hemácias de cada compartimento com 10 µL de solução de Triton X-100 a 0,25 %. Eram ainda reservados compartimentos que continham somente as hemácias e tampão para se fazer o controle da lise espontânea que era sempre deduzida dos resultados. A lise espontânea de todos os experimentos aqui relatados nunca ultrapassou 6%. Os resultados foram expressos em gráficos onde, no eixo das abscissas foram expressos os fatores de diluição dos extratos do parasita e no eixo das coordenadas as porcentagens de lise. Cada experimento era feito em duplicata e os resultados apresentados são provenientes de um experimento representativo repetido pelo menos três vezes. Alguns experimentos foram feitos utilizando-se apenas o primeiro ponto de diluição sob diferentes tratamentos, obtendo-se assim resultados que variam de 0 a 100% de hemólise para este ponto. Eventualmente, Ext-ms foi tratado com o agente dissociante cloreto de guanidina (g-HCl) antes ou depois de sua interação com hemácias, tratamento que ativa a citolisina. Ext-ms também fervido para realização de alguns experimentos.

Em outros experimentos, Ext-ms era incubado na presença de diferentes concentrações de Proteinase K (Sigma) (50, 100, 200 ou 500 µg/mL) por cerca de 18 horas a 37 °C, antes da realização do ensaio hemolítico.

### **2.3.3- Ensaios de inibição da atividade lítica por DPPC e Colesterol.**

Ext-ms foram tratados com quantidades crescentes de DPPC ou Colesterol (0 – 0,25 – 1 – 5 – 10 – 50 µg/mL) preparados em solução etanólica. Depois de 10 minutos de incubação à temperatura ambiente o extrato era então ensaiado para se verificar a inibição da atividade lítica. Experimentos controles eram realizados utilizando somente a quantidade equivalente de etanol aportada para cada extrato e não tiveram nenhum efeito na atividade lítica.

### **2.3.4- Ensaios de geração de atividade hemolítica.**

Os experimentos de geração de atividade hemolítica eram feitos incubando-se o Ext-ms durante 18 horas a 37 °C ou adicionando-se 500 mM de cloreto de guanidina (g-HCl), agente dissociante, tratamentos que ativam a citolisina pela digestão de um oligopeptídeo inibidor ou por sua dissociação da molécula lítica (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010). Após esses tratamentos, o extrato era ensaiado para verificar o aumento da atividade hemolítica. Em alguns experimentos esse ensaio era feito na presença de 10 mM do inibidor de serino-proteases PMSF diluído em etanol ou de etanol apenas, como controle.

### **2.3.5- Preparo de lipossomos unilamelares.**

Os lipossomos utilizados neste trabalho foram preparados sob a supervisão do Prof. Dr. Frédéric Frézard. Foram preparados lipossomos unilamelares compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) ou dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), contendo ou não colesterol, segundo protocolo abaixo adaptado de Frézard, 1999.

L  $\alpha$ -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) ou dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) (30 mM) com ou sem colesterol (20 mM) eram dissolvidos em clorofórmio dentro de um balão de vidro contendo pérolas de vidro que era conectado a um evaporador giratório com temperatura do banho de 45-50°C. Formava-se nesta etapa um filme lipídico na superfície interna do balão de vidro. Adicionava-se então PBS em quantidade necessária para o volume final calculado e a suspensão formada era submetida a 10 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Nesta etapa já se formavam vesículas grandes e multilamelares que não nos interessavam. A suspensão era então impulsionada por pressão, através de um gás inerte, a entrar dentro de uma câmara extrusora por onde passava por um filtro de 0,2  $\mu$ m. Este procedimento era repetido cerca de 10 vezes. Nesta etapa formavam-se as vesículas menores que eram, em seguida, filtradas através de um novo filtro de mesmo tamanho, mas em condições estéreis para que, enfim, a suspensão pudesse ser estocada. Assumia-se então que os lipossomos obtidos tinham tamanho igual ou inferior a 0,2  $\mu$ m.

Para alguns experimentos, utilizamos lipossomos contendo calceína encapsulada. Os filmes lipídicos eram feitos da mesma forma que para os lipossomos anteriores, à exceção do colesterol, pois preparamos lipossomos de DPPC sem colesterol e com

concentrações crescentes de colesterol 10, 15, 20 e 30% desse lipídeo em relação ao DPPC. Ao tubo contendo o filme lipídico eram acrescentados 800  $\mu\text{L}$  de uma solução de calceína 0,075 M (Sigma) que eram então submetidos à agitação em vórtex por cerca de 3 minutos e colocado em banho-maria a 45-50  $^{\circ}\text{C}$ , alternando-se a agitação e o banho-maria até que todo o filme lipídico se hidratasse; a suspensão formada era então submetida à ultrasonicação utilizando-se 20 % da potência total do aparelho sonicador (Sonics Vibra-Cell, USA), após o que, os lipossomos eram formados. Logo antes de ser utilizada, essa suspensão era submetida a uma filtração em gel Sephadex G50 DNA Grade (Amersham), para a obtenção apenas de lipossomos com calceína encapsulada e não fluorescente. A coluna era previamente equilibrada com tampão acetato (tampão acetato de sódio-ácido acético 20 mM, pH 5,5 com 150 mM de cloreto de sódio), o mesmo a ser utilizado nos experimentos que se seguiriam. Depois de equilibrada, eram inoculados na coluna 80  $\mu\text{L}$  da suspensão de lipossomos que eram então impulsionados com 200  $\mu\text{L}$  de tampão acetato, a fração não fluorescente e contendo os lipossomos com calceína encapsulada era coletada nos primeiros 100  $\mu\text{L}$ .

### **2.3.6- Remoção da atividade lítica por hemácias ou lipossomos.**

Para verificar se hemácias eram capazes de remover a atividade hemolítica do extrato, 10  $\mu\text{L}$  de Ext-ms diluídos em 200  $\mu\text{L}$  de tampão acetato eram submetidos à incubação por tempos variados e no gelo com 2, 5, 10 ou 20 x 10<sup>6</sup> hemácias. Após sedimentar essas células, os sobrenadantes obtidos eram transferidos para microplaca, acrescidos de 5 x 10<sup>6</sup> novas hemácias cada um e seguia-se o ensaio hemolítico. Em alguns experimentos de ativação da citolisina já ligadas às células após o tratamento acima, 500 mM de g-HCl eram acrescentados ao tampão de lise. Nesta concentração, não há interferência do reagente na integridade das hemácias, mesmo quando incubadas posteriormente com Ext-ms hemoliticamente ativo.

No caso dos lipossomos, 100  $\mu\text{L}$  de Ext-ms eram incubados com quantidades crescentes de vesículas (o equivalente a 5, 15, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão). Ressuspendidos no extrato, os lipossomos eram então sedimentados a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante era ensaiado quanto à sua atividade hemolítica. Em alguns experimentos os extratos eram diluídos em tampão acetato antes de se fazer o protocolo de remoção, bastando, após sedimentação dos lipossomos, acrescentar as 5 x 10<sup>6</sup> hemácias ao sobrenadante e verificar a atividade hemolítica restante. O protocolo de remoção da

atividade com lipossomos podia seguir variações segundo a atividade lítica do extrato. Em alguns experimentos fizemos curvas de diluição a fim de determinar o mínimo de lipossomos necessários para que toda atividade lítica fosse removida dos extratos, o que foi feito para alguns experimentos de geração de atividade.

Como cada preparação pode render quantidades diferentes de lipossomos, cada suspensão de lipossomos obtida era padronizada quanto à sua capacidade de remover a atividade hemolítica.

## **2.4- Determinação da lise de lipossomos.**

10  $\mu$ L da suspensão de lipossomos com calceína eram diluídos em 90  $\mu$ L de tampão acetato, acrescentados de 2,5  $\mu$ L de Ext-ms e incubados a 37 °C ou a 0 °C. Em intervalos determinados, eram retiradas alíquotas de 5  $\mu$ L que eram diluídas em 2 mL de tampão acetato. O método se baseia no fato de que a calceína concentrada e isolada do meio aquoso externo dentro dos lipossomos íntegros, não emite fluorescência. Se diluída, no entanto, a calceína fluoresce. Assim, a lise de lipossomos é evidenciada quando a calceína escapa das vesículas, dilui-se no meio e fluoresce. A leitura da fluorescência emitida era feita utilizando um fluorímetro (Varian Cary Eclipse). As amostras, colocadas em uma cuveta de quartzo de quatro faces lisas (Sigma), eram excitadas no comprimento de onda de 490 nm e a fluorescência emitida era lida no comprimento de onda de 515 nm. Como controles, foram utilizados 2,5  $\mu$ L do mesmo tampão do Ext-ms (ácido bórico-NaOH 0,4 % CHAPS) ou 2,5  $\mu$ L de Ext-ms fervido por 5 minutos. Alguns experimentos de liberação de calceína encapsulada foram feitos colocando-se em contato direto com os lipossomos contendo calceína aqueles lipossomos que removeram a atividade hemolítica de Ext-ms. Estes lipossomos eram lavados 3 vezes com PBS antes de serem incubados com os lipossomos que continham calceína. Como controle, foi utilizada a mesma quantidade de lipossomos que não tiveram contato prévio com Ext-ms. No final dos experimentos de liberação de calceína, acrescentávamos 20  $\mu$ L do detergente CHAPS 4% a cada amostra lida para verificar que a mesma estava presente e não fluorescia por estar encapsulada ou que a lise tinha atingido seu ápice. A fluorescência total liberada e medida era assumida como sendo de 100 % e a lise relativa das amostras era calculada.

## **2.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).**

Os lipossomos contendo moléculas co-removidas com a atividade hemolítica ou frações provenientes das cromatografias eram colocados diretamente em tampão de amostra redutor (Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8 com 12,5% de glicerol p/v, 0,002 % de azul de bromofenol p/v, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 8,5% de SDS). Este tampão de amostra é uma modificação dos comumente utilizados; ele possui uma quantidade maior de SDS que facilita a dissolução dos lipídeos para que os mesmos não atrapalhassem a eletroforese. As amostras eram então aquecidas por 5 minutos a 100 °C e eram então fracionadas em SDS-PAGE utilizando-se géis de separação 12,5 % que eram preparados com uma solução de acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad, USA) na proporção de 29:1 em 375 mM de Tris-HCL pH 8,8 e 0,1 % de SDS. O gel de concentração era preparado em Tris-HCL 125 mM pH 6,8 contendo 4 % de acrilamida, 0,1 % de bis-acrilamida e 0,1 % de SDS. A corrida era feita sob tensão constante de 200 V por cerca de 45 minutos em mini-géis (Bio-Rad), utilizando-se como tampão de corrida Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3 contendo 0,1 % de SDS. Os géis assim obtidos eram corados pela prata segundo Kit Plus One (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) ou por Coomassie Blue sendo utilizados em ambos, padrões de peso molecular (Invitrogen).

## **2.6- Tripsinização de proteínas *in situ*, eluição de peptídeos trípticos e análises de espectrometria de massa.**

Após eletroforese em condições desnaturantes e redutoras, o gel era corado pelo método do Coomassie Coloidal G250 (Bio-Rad). As bandas a serem tripsinizadas eram removidas do gel e cortadas em pedaços bem pequenos. Os fragmentos eram colocados em tubos siliconizados, previamente lavados com metanol-água-metanol para limpeza dos mesmos. Em seguida, o gel era descorado com 3 lavagens de 15 minutos sob agitação com a solução de descoloração (acetonitrila 50 %, bicarbonato de amônio 25mM, pH 8,0). Após descoloração, os fragmentos do gel eram desidratados com 200  $\mu$ L de acetonitrila que eram em seguida removidos e os tubos centrifugados em *Speed Vac* (Eppendorf) para evaporar toda a acetonitrila. Uma vez desidratados, os fragmentos eram hidratados com 10  $\mu$ L de solução de tripsina para espectrometria (20  $\mu$ g/ml) (Promega). Em seguida eram adicionados 20  $\mu$ L de uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM e os fragmentos eram então incubados por 16-24 horas a 37 °C. Após

esta incubação, o conteúdo líquido do tubo era transferido para outro tubo e aos fragmentos eram acrescentados 30 µL da solução de extração de peptídeos trípitos (ácido fórmico 5 %, acetonitrila 50 %). O tubo permanecia sob agitação constante durante meia hora e, em seguida, o eluato era acrescentado aos 20 µL anteriores. Este procedimento era repetido mais uma vez, e as amostras eram concentradas em *Speed Vac* (Eppendorf) até o volume de 10 µL. Em seguida, os peptídeos eram purificados, concentrados e dessalinizados em colunas ZIP-TIP (Eppendorf). Os peptídeos purificados ficavam em solução de acetonitrila 50 %, e 0,1 % TFA. Em alguns experimentos onde a tripsinólise foi feita diretamente na solução a ser digerida, utilizamos tripsina imobilizada em *bits* (Promega) na mesma concentração, sua remoção da suspensão a ser analisada era feita por centrifugação a 10.000 g por 30 segundos. Os produtos obtidos após tripsinização eram enviados para análise em espectrômetro de massa do tipo MALDI-Tof-Tof, módulo que permite tanto a obtenção de espectros de massa quanto o seqüenciamento de peptídeos, o que foi feito com a colaboração dos Drs. Alexander Chapeaurouge, Jonas Peralez (Fiocruz, Rio de Janeiro), Marcelo Bemquerer e Luciano Paulino (EMBRAPA-Cernargem, Brasília). O padrão de massas obtido era comparado com o padrão de massas de proteínas depositadas em bancos de dados. Utilizamos o programa *Mascot* e o banco de dados *Swiss Prot* e do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para identificar as proteínas através do *fingerprint* trípito e da confirmação da identificação através da comparação de sequências peptídicas delas derivadas com proteínas já identificadas e depositadas nesses bancos de dados. Moléculas não protéicas também foram identificadas pela análise de seus perfis de fragmentação.

## **2.7- Cromatografias.**

Os extratos utilizados eram testados para se verificar a presença de atividade lítica e preparados desde o descongelamento dos parasitas na presença de um coquetel de inibidores de proteases (Proteases Inhibitor Mix - GE HealthCare) e EDTA para inibição da atividade de metaloproteases. Em seguida o volume de extrato referente a até 1 mg de proteínas era injetado em colunas analíticas e cromatografados. Após cada cromatografia cada fração era avaliada pelo ensaio hemolítico, passando-se a fração ativa para o próximo passo de purificação. De modo geral, seguimos os seguintes passos: 1) troca iônica em coluna Resource-Q com eluição em gradiente que se alternava

contínuo/descontínuo de 0 a 1 M de NaCl em tampão borato pH 8,0; 2) filtração molecular em coluna Superose 12 com eluição das frações no mesmo tampão utilizado para se preparar os extratos (tampão borato, pH 7,0 / 0,4 % CHAPS), As frações ativas vindas da filtração molecular eram então submetidas à 3) fase reversa em coluna C18 ou C8 utilizando um gradiente de 0 a 100 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA) em gradiente contínuo (foram utilizados gradientes de 50 ou 40 minutos). Em alguns experimentos, invertemos a etapa filtração molecular com a de troca iônica e em alguns outros realizamos a filtração molecular na presença do agente dissociante cloreto de guanidina (g-HCl) na concentração de 500 mM, de Ext-ms previamente tratado com a mesma concentração desse reagente. Quando necessário, as amostras eram dialisadas para se trocar o pH ou livrá-las de reagentes indesejáveis como g-HCl. Para tanto efetuávamos a diálise em duas etapas de 10 horas cada com troca do volume de tampão de modo a permitir que ao final a amostra fosse diluída cerca de 20.000 vezes contra o tampão desejado. Foram utilizadas membranas de diálise Thermo Scientific (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) cujos poros eram de 2000 MW.

Efetuamos ainda cromatografias de fase reversa em C8 de Ext-ms previamente digerido com 100 µg/mL de proteinase K em gradiente linear (0 – 100%) de acetonitrila (0,1 % TFA). Após coleta das frações alíquotas das mesmas eram transferidas para microplacas que eram então incubadas por duas horas a 37 °C para se evaporar o solvente. Em seguida cada poço era acrescido de 200 µL de tampão acetato contendo  $5 \times 10^6$  hemácias e seguia-se o ensaio hemolítico para localizarmos a fração lítica.

As leituras das absorbâncias de cada cromatografia eram feitas a 280 e/ou 214 nm como indicado em cada resultado. Nas figuras das cromatografias de fase reversa as porcentagens indicadas nos picos de atividade mostram a quantidade relativa de acetonitrila necessária para eluição do pico. Todos os volumes de lavagem da coluna, no início e no final do gradiente, eram coletados para nos certificarmos que nossa atividade havia interagido de forma ótima com a coluna, não saturando-a e ao mesmo tempo não ficando nela retida. Os gradientes, as absorbâncias e as atividades líticas nas frações colhidas encontram-se plotados e indicados em cada figura.



## **2.8- Microscopia de Força Atômica.**

As imagens feitas por microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy - AFM) foram captadas à temperatura ambiente (19-23°C) com o equipamento Dimension 3100 e controlador Nanoscope IIIa, ambos da Digital Instruments. As imagens foram feitas pela técnica de *Tapping Mode* usando sondas de sílica com raio nominal de curvatura de 5.0 – 10.0 nm, frequência de ressonância de aproximadamente 60 kHz e oscilação constante de 3.0 – 7.1 N/m. As imagens foram captadas usando-se 1 kHz de escala de varredura. O limite de amplitude foi mantido o mais alto possível para que não ocorresse influência da pressão da sonda no contraste topográfico e para evitar danos à amostra. Utilizamos como amostras tanto membranas de hemácias como filmes lipídicos que haviam sido previamente incubados com Ext-ms hemoliticamente ativos. Procurávamos por danos e/ou deformações na topografia da bicamada lipídica induzidos pelas moléculas líticas desse extrato.

### **2.8.1- Membranas de hemácias.**

Hemácias ( $5 \times 10^6$ ) eram incubadas com 10  $\mu$ L de extratos hemoliticamente ativos a 0 °C por 15 minutos. Após incubação as hemácias eram sedimentadas, concentradas, re-incubadas, repetindo-se o ciclo por até duas vezes. Na etapa final eram sedimentadas, concentradas para o volume de 10  $\mu$ l e incubadas a 37 °C por 30 minutos para que a lise se consumasse. Uma vez lisadas, um esfregaço era feito em lâmina de microscópio ou de mica recém clivada. Após secagem à estufa (37 °C) a amostra era analisada por AFM. Membranas de hemácias não lisadas incubadas seguindo o mesmo protocolo com o Ext-ms previamente fervido eram utilizadas como controle negativo. As análises das imagens obtidas eram feitas utilizando-se o software Nanoscope III da Digital Instruments.

### **2.8.2- Filmes lipídicos obtidos com lipossomos.**

Lipossomos de DPPC ou DOPC eram incubados no gelo com extratos hemoliticamente ativos do parasita. Os lipossomos, que removiam toda atividade do extrato, eram sedimentados, concentrados e re-incubados com extratos ativos. Este processo era repetido de 5 a 10 vezes com o intuito de saturá-los da citolisina). Ao final do último ciclo, uma vez sedimentados e lavados 3 vezes em PBS e contendo moléculas

líticas em suas superfícies, os lipossomos eram então incubados a 37°C e utilizados na preparação de filmes lipídicos. Para preparo das amostras utilizamos protocolos já bem estabelecidos na literatura (Puntheeranurak et al., 2005 e Richter et al., 2006). De modo geral, os lipossomos eram colocados em uma placa de mica recém clivada e planarizados pela incubação à temperatura de transição de fase dos lipídeos, o filme lipídico assim formado era mais uma vez seco com jato de argônio e então analisado ao microscópio de força atômica. Como controle, incubávamos os lipossomos com Ext-ms fervido, que eram utilizados para o preparo dos extratos antes do preparo do filme lipídico. Outro controle negativo que utilizamos foram filmes lipídicos feitos com lipossomos de DOPC incubados com Ext-ms ativo, uma vez que esses lipossomos não são lisados pelos extratos.

Todos os gráficos deste trabalho representam experimentos representativos reprodutíveis, repetidos pelo menos três vezes.

## **3-RESULTADOS**

### **3.1- Atividade hemolítica de extratos ricos em membrana de promastigotas de *L. amazonensis* (Ext-ms).**

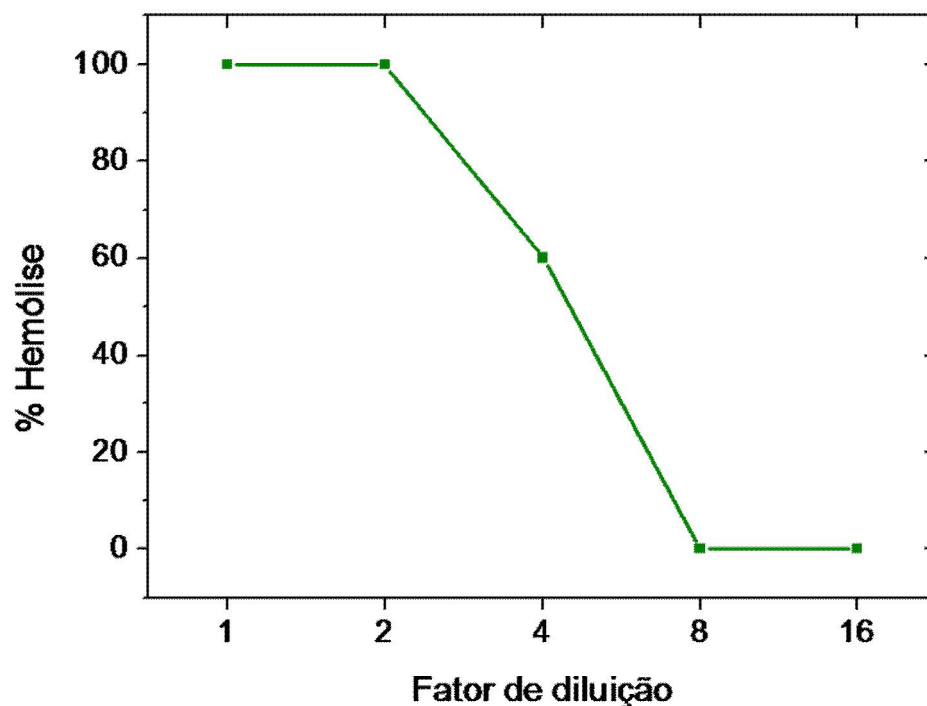
Já havia sido mostrado anteriormente pelo nosso grupo que, em promastigotas, a leishporina de *L. amazonensis* está localizada na fração de membranas do extrato total do parasita, provavelmente solúvel no interior de vesículas (Noronha et al., 1996). Assim, em todos os nossos experimentos utilizamos a fração rica em membranas do extrato total solubilizada em detergente (em concentração não-hemolítica) (Ext-ms). Para verificarmos se os Ext-ms preparados para os nossos experimentos estavam ativos, realizávamos um ensaio hemolítico após a preparação de cada extrato. Na figura 2 está o resultado representativo da atividade hemolítica que, de modo geral, era encontrada nos extratos obtidos de  $2 \times 10^9$  parasitas/mL, logo após sua preparação.

### **3.2- Caracterização da ligação da leishporina em células-alvo.**

#### **3.2.1 Remoção da atividade hemolítica de Ext-ms por hemácias ou lipossomos.**

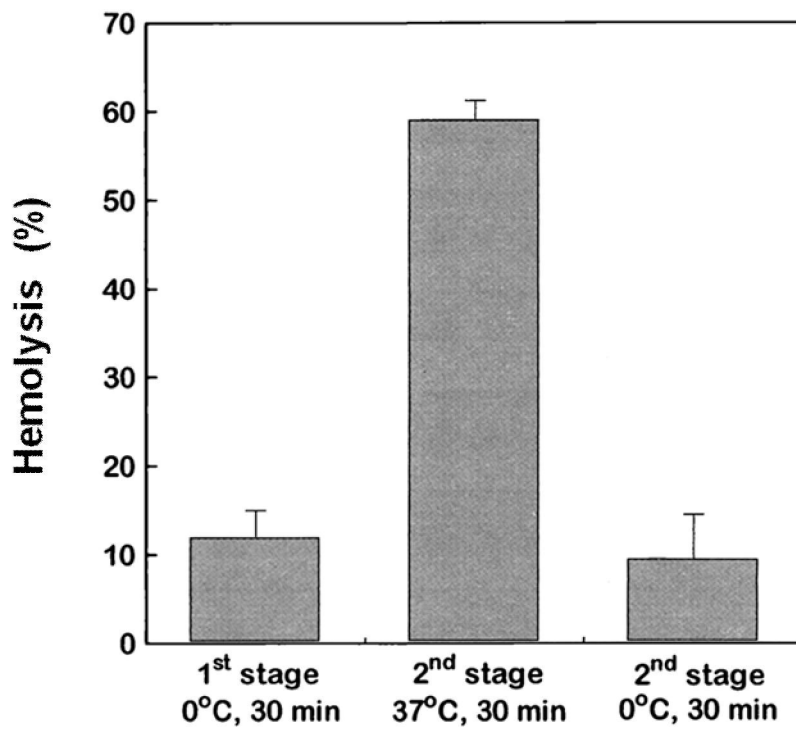
Experimentos anteriores haviam demonstrado que podemos distinguir, por manipulação da temperatura, uma etapa de ligação da leishporina à membrana das hemácias da etapa da lise propriamente dita. Assim, foi verificado que a ligação é independente da temperatura, ocorrendo mesmo a 0 °C. Nesta temperatura não há lise de hemácias, o que só sobrevém com o aumento da temperatura, ocorrendo de maneira ótima a 37 °C (Fig. 3, resultado de Noronha et al., 2000).

Para verificar se, por se ligarem à citolisina, as hemácias eram capazes de remover a atividade hemolítica do Ext-ms, incubamos a 0 °C o Ext-ms com quantidades crescentes de hemácias. Sedimentadas as células, o sobrenadante era analisado quanto à sua atividade hemolítica. Verificamos que a atividade hemolítica diminuiu de forma dose-dependente em relação à quantidade de hemácias previamente incubadas com o extrato (Fig. 4A), confirmando que a leishporina se liga à membrana dessas células.



**Figura 2 – Atividade hemolítica de extrato rico em membranas (Ext-ms) de promastigotas de *L. amazonensis*.**

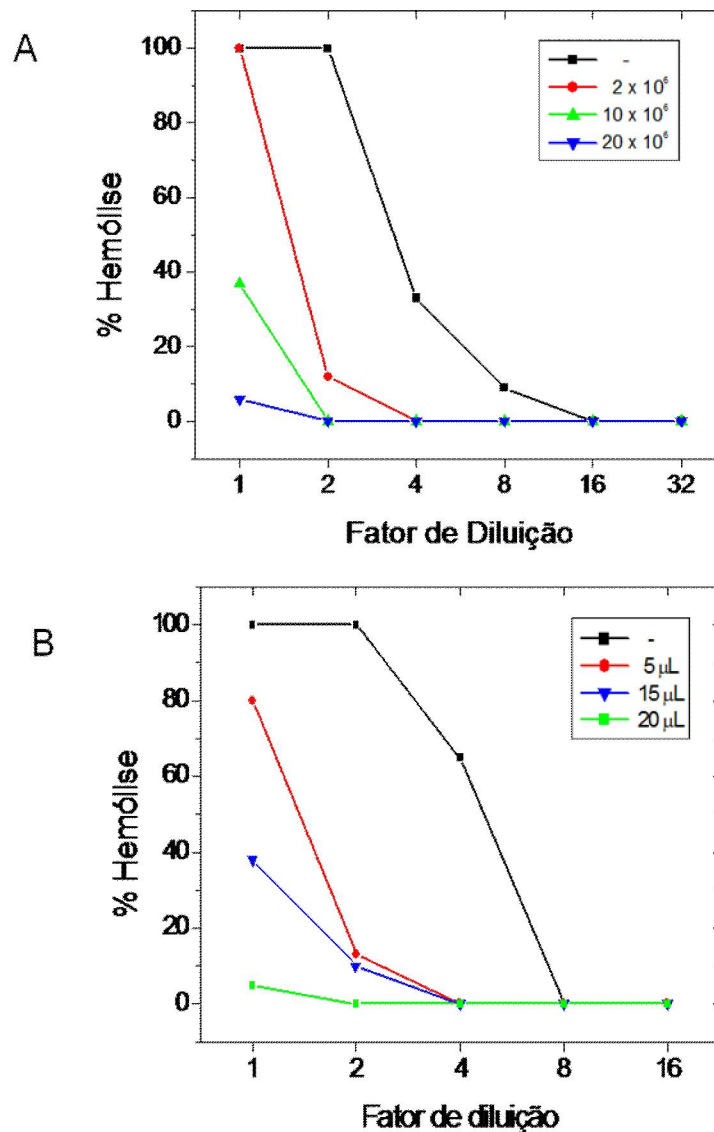
Ext-ms diluídos em série (1:2) eram incubados com  $5 \times 10^6$  hemácias humanas em 200  $\mu$ L tampão acetato de sódio durante 30 minutos a 37 °C. As hemácias eram sedimentadas e o sobrenadante era lido a 414 nm para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica está expressa em percentagem de hemólise, calculada em relação à lise obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias.



**Figura 3 – Dissociation of the membrane binding and lytic activities of leishporin.**

HuRBC were incubated with cExt at pH 5.5 for 30 min on ice. The suspension was centrifuged at 4°C, and lysis was determined (first stage). Cells were extensively washed with ice-cold assay buffer, resuspended in the same buffer to the initial volume, and incubated at 0 or 37°C for another 30 min, and lysis was determined (second stage).

**(reproduzido de Noronha *et al.*, 2000)**



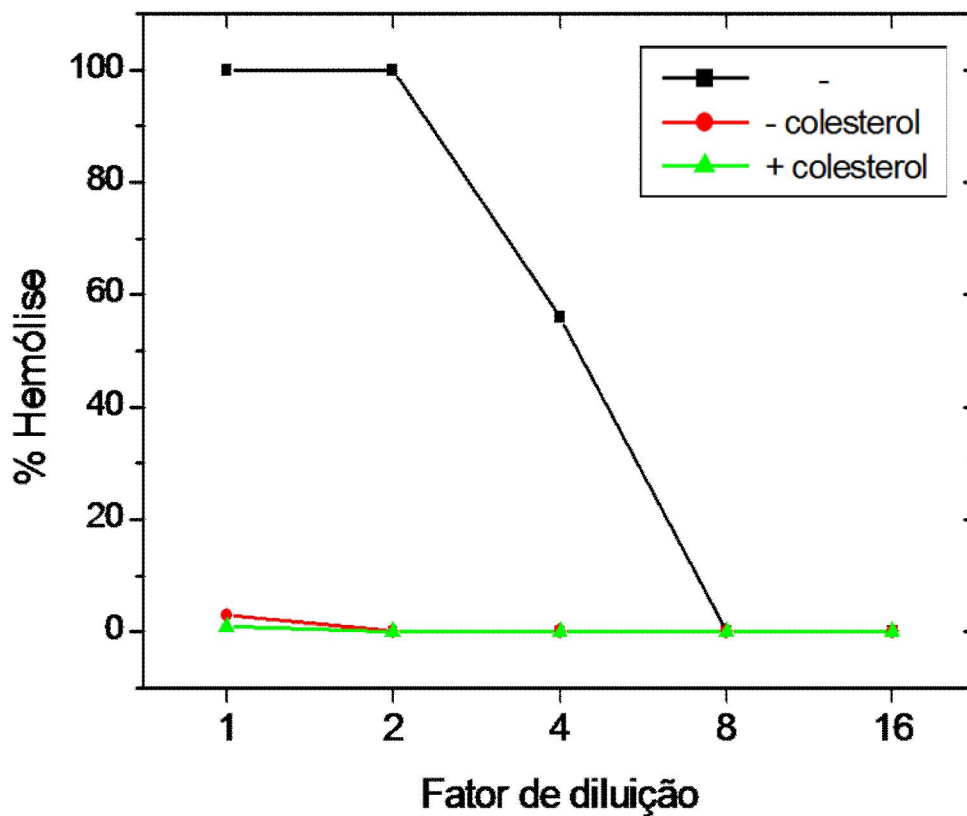
**Figura 4 – Remoção da atividade hemolítica de Ext-ms por hemácias e lipossomos.**

**A-** Ext-ms eram incubados ou não com quantidades crescentes de hemácias ( $2 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  e  $20 \times 10^6$ ) no gelo durante 5 minutos. As hemácias eram sedimentadas e a cada sobrenadante eram acrescentadas  $5 \times 10^6$  novas hemácias. Seguiu-se uma nova incubação, desta vez a  $37^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. **B-** Ext-ms eram incubados com quantidades crescentes da suspensão de lipossomos (DPPC + colesterol) à temperatura ambiente por 5 minutos. Os lipossomos eram sedimentados e a cada sobrenadante eram acrescentadas  $5 \times 10^6$  hemácias. Seguiu-se uma incubação a  $37^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. Para os dois experimentos A e B, as hemácias eram sedimentadas e a atividade hemolítica restante era determinada.

Resultados anteriores de nosso grupo já haviam indicado que a ligação da leishporina às hemácias é independente de proteínas ou carboidratos da membrana citoplasmática. Utilizando lipossomos multilamelares também já foi mostrado que a leishporina se liga diretamente a lipídeos (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010). No presente trabalho, confirmamos esses dados, estudando os lipídeos como os possíveis sítios de ligação para a leishporina, utilizando agora lipossomos unilamelares que melhor mimetizam as membranas citoplasmáticas naturais. Sendo assim, avaliamos a propriedade de ligação da leishporina a lipossomos unilamelares compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e colesterol. A figura 4B mostra que, como esperado, os lipossomos unilamelares foram capazes de remover a atividade hemolítica do Ext-ms, também de maneira dose-dependente. A remoção da atividade hemolítica é da mesma forma alcançada com lipossomos unilamelares compostos de dioleilfosfatidilcolina (DOPC) (resultado não mostrado) e colesterol. Verificamos ainda que a remoção da atividade hemolítica é imediata, uma vez que o sobrenadante perde a atividade hemolítica após a incubação com os lipossomos pelo tempo de 30 segundos, tempo mínimo da manipulação (resultados não mostrados). Esses resultados indicam que a leishporina se liga instantaneamente aos lipossomos sendo co-sedimentada com os mesmos.

Como, além de fosfolípides, o colesterol é um dos principais constituintes da membrana plasmática de células de mamíferos, decidimos verificar se esse lipídeo, presente nas preparações dos lipossomos, era determinante para a remoção da atividade hemolítica. Deste modo preparamos dois tipos de lipossomos cuja única diferença era a presença ou ausência de colesterol. No ensaio de remoção da atividade hemolítica por esses lipossomos, verificamos que os dois tipos de lipossomos foram igualmente capazes de remover a atividade hemolítica de Ext-ms, mostrando que a ligação da citolisina aos lipossomos é independente de colesterol (Fig. 5).

A ligação da leishporina aos lipossomos nos serviu para dois propósitos: estudar os requisitos mínimos de interação da leishporina com membranas-alvo para a formação de poros e tentar obter e purificar a leishporina ligada a eles. Os próximos resultados mostram alguns aspectos dessa interação. Dados da purificação serão mostrados mais adiante.



**Figura 5 – Efeito do colesterol da composição de lipossomos de DPPC sobre a sua capacidade de remover a atividade hemolítica de Ext-ms.**

Ext-ms foram incubados ou não com 20  $\mu$ L lipossomos de DPPC contendo ou não colesterol. Após sedimentação dos lipossomos a atividade hemolítica do sobrenadante foi avaliada pelo ensaio hemolítico.



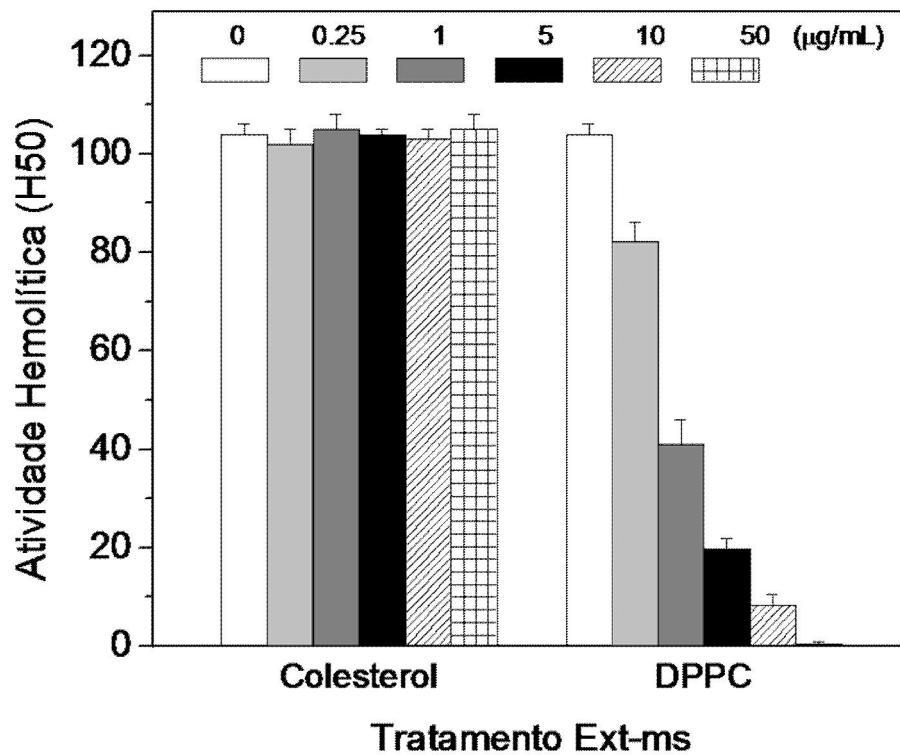
### **3.2.2- Efeito do tratamento com colesterol ou DPPC na atividade hemolítica do Ext-ms.**

A remoção da atividade lítica por lipossomos sem colesterol mostrou que a citolisina estava se ligando diretamente aos fosfolípidos. Decidimos então verificar se o colesterol e o DPPC separadamente eram capazes de inibir a atividade lítica quando incubados em solução com extratos ativos. Na figura 6, verificamos que enquanto o DPPC inibiu completamente a atividade hemolítica, o colesterol, nem mesmo em altas concentrações, foi capaz de inibir esta atividade, corroborando o resultado anterior de que essa molécula não é um sítio de ligação para a leishporina. Assim, mostramos que a leishporina se liga diretamente aos fosfolípidos na célula-alvo, sendo provável que esta ligação, em pH e temperatura adequados, seja suficiente para que a citolisina se insira nas membranas, formando poros e lisando as células.

### **3.2.3- Lise de lipossomos por Ext-ms.**

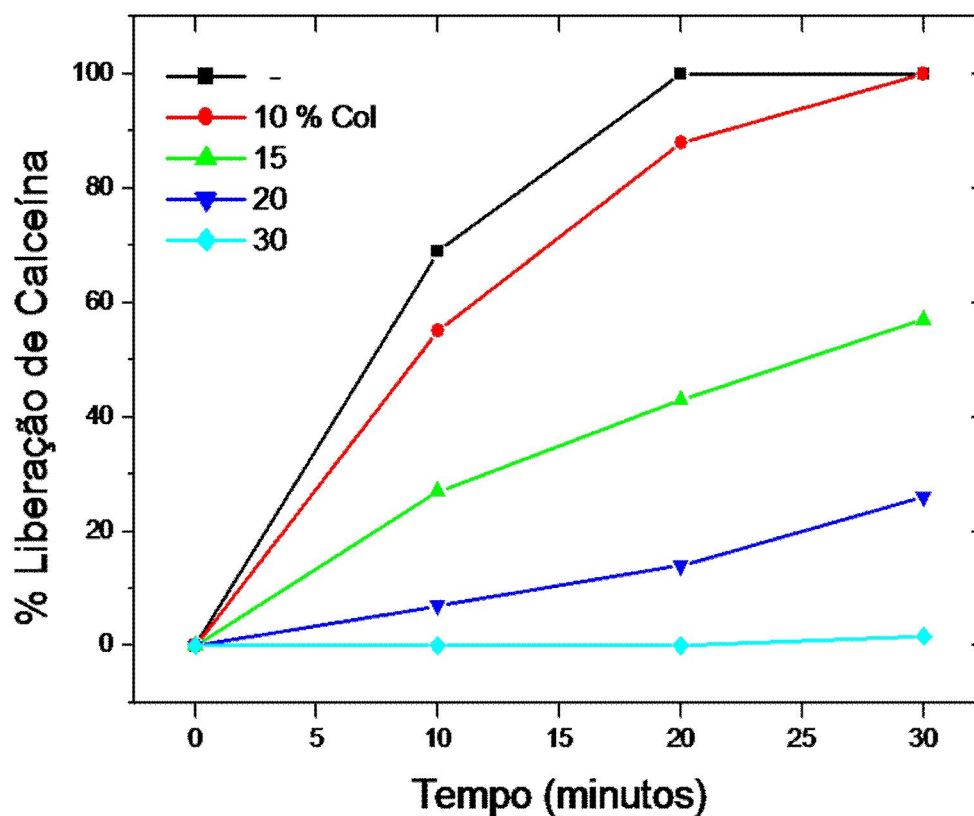
Para verificar se os lipossomos que removiam a atividade hemolítica de Ext-ms eram também lisados, utilizamos lipossomos de DPPC ou DOPC com ou sem colesterol, contendo calceína encapsulada em seu interior que, se liberada dessas vesículas, indicaria a lise das mesmas. A calceína é um fluorófilo que, quando concentrado no interior de vesículas, não fluoresce, mas diluída no meio, caso haja permeabilização das mesmas, torna-se fluorescente.

Assim, lipossomos unilamelares compostos de DPPC contendo diferentes proporções de colesterol, foram incubados com o Ext-ms e a liberação da calceína foi acompanhada em função do tempo. A figura 7 mostra que Ext-ms é capaz de lisar lipossomos de DPPC e DPPC/colesterol. No entanto, à medida que se aumenta a concentração deste último na composição da membrana lipídica, os lipossomos deixam de ser lisados. Lipossomos contendo 30% de colesterol não são lisados, permanecendo tão estáveis quanto os lipossomos controle, incubados pelo mesmo período na ausência do Ext-ms (Fig. 7). Vale lembrar que ambos os tipos de lipossomos são capazes de remover toda a atividade hemolítica do Ext-ms (Fig. 5). É interessante mencionar ainda que embora lipossomos de DOPC sejam capazes de remover toda a atividade hemolítica presente nos extratos, indicando que a leishporina se liga a esse lipídeo, eles não são susceptíveis à lise mediada pela citolisina (resultado na Fig. 16A). Deste modo, os experimentos seguintes foram realizados com lipossomos de DPPC sem colesterol.



**Figura 6 – Efeito de DPPC e colesterol sobre a atividade lítica de Ext-ms.**

Ext-ms (na maior diluição a causar 100 % de lise) foi incubado previamente com quantidades crescentes de DPPC ou Colesterol nas concentrações indicadas em suspensão etilica. Ao Ext-ms tratado foram adicionadas  $5 \times 10^6$  hemácias e a suspensão foi incubada a 37°C. Após sedimentação das células não rompidas a hemólise foi determinada pela leitura da hemoglobina liberada no sobrenadante.



**Figura 7 – Efeito do colesterol na composição de lipossomos sobre sua susceptibilidade à lise.**

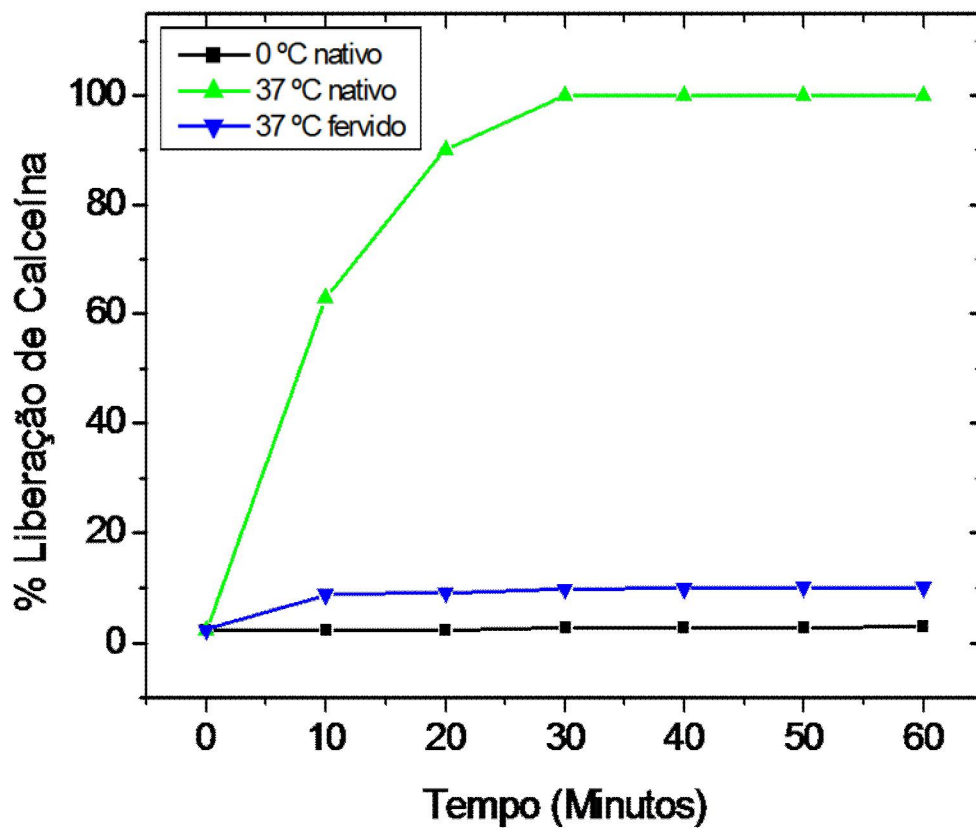
Lipossomos contendo quantidades crescentes de colesterol e contendo calceína encapsulada foram incubados com Ext-ms a 37 °C. Nos intervalos indicados, a fluorescência era medida em fluorímetro, como descrito em Material e Métodos. O detergente CHAPS diluído mesmo tampão e na mesma concentração em que estava o Ext-ms (não mostrado) não apresentou atividade lítica para os lipossomos.

### **3.2.4- Efeito da temperatura na atividade lítica de Ext-ms e no processo de lise de lipossomos.**

Já havia sido mostrado anteriormente que a leishporina em Ext-ms é termolábil, sendo sua atividade hemolítica completamente destruída pelo aquecimento a 100 °C. Aqui, mostramos que o mesmo ocorre com a atividade lipolítica do Ext-ms, que quando fervido por 5 minutos torna-se incapaz de lisar os lipossomos, como verificado pela ausência de liberação de calceína (Fig. 8). Também como já mencionado, resultados anteriores de nosso grupo mostraram que a 0 °C a leishporina não tem atividade hemolítica (Noronha et al., 2000). Também o processo de lise dos lipossomos é dependente da temperatura, como verificado também na figura 8, que mostra que as vesículas incubadas com Ext-ms no gelo não são lisadas como ocorre a 37 °C.

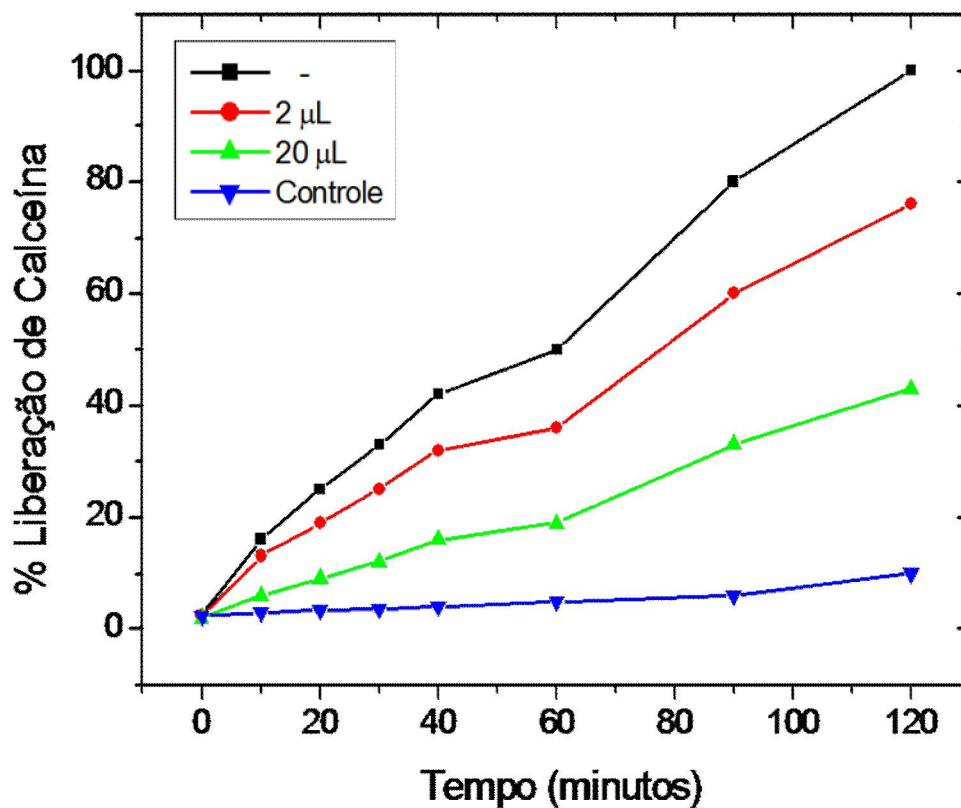
### **3.2.5- Remoção da atividade lipolítica de Ext-ms por lipossomos.**

Decidimos, em seguida, verificar se o Ext-ms previamente incubado com lipossomos, procedimento que remove a atividade hemolítica desse extrato, também removia sua capacidade de permeabilizar os lipossomos. Deste modo, incubamos o Ext-ms com quantidades crescentes de lipossomos de DPPC e ensaiamos o sobrenadante destas preparações quanto à sua capacidade de permeabilizar o mesmo tipo de lipossomos contendo calceína. Como esperado, a atividade lítica do Ext-ms para lipossomos também foi removida de forma dose-dependente pela incubação prévia com outros lipossomos de DPPC (Fig. 9).



**Figura 8 – Efeito da temperatura na lise de lipossomos.**

Lipossomos contendo calceína foram incubados com Ext-ms fresco (a 4 °C ou a 37 °C) ou fervido (a 37 °C). A calceína liberada foi medida em fluorímetro nos intervalos de tempo indicados, como descrito em Material e Métodos.



**Figura 9 – Remoção da atividade lipolítica Ext-ms por lipossomos.**

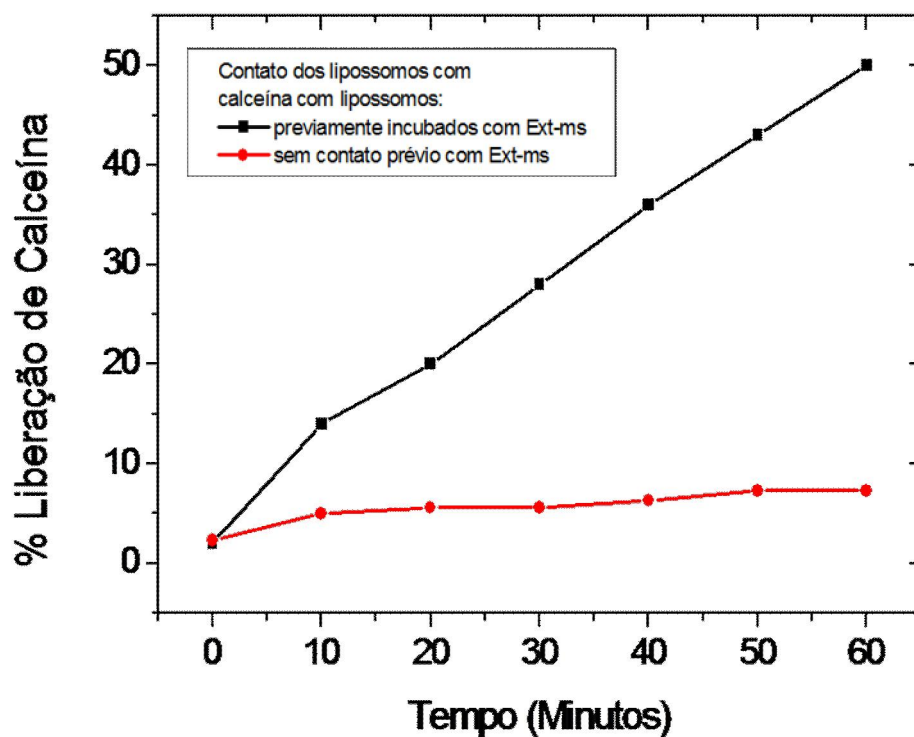
Ext-ms recém-preparados ou após remoção de sua atividade hemolítica com quantidades crescentes de lipossomos, foram incubados com lipossomos contendo calceína a 37 °C e liberação de calceína foi medida em fluorímetro nos intervalos indicados. O detergente CHAPS diluído mesmo tampão e na mesma concentração em que estava o Ext-ms (controle) não apresentou atividade lítica para os lipossomos.

### **3.2.6- Lise de lipossomos mediada por lipossomos que removeram a atividade hemolítica de Ext-ms.**

Os experimentos anteriores mostraram que, à semelhança do que ocorre com as hemácias, Ext-ms de *L. amazonensis* é capaz de lisar lipossomos unilamelares compostos apenas de DPPC ou com determinado conteúdo de colesterol. A demonstração de que esses lipossomos removem a atividade hemolítica e lipolítica de Ext-ms de *L. amazonensis* sugeriu que uma ou mais das moléculas ligadas aos lipossomos fosse(m) a leishporina. No entanto, outra possibilidade que precisávamos descartar era a de que os lipossomos estivessem removendo não a leishporina, mas um componente sem o qual a lise não ocorreria, ou ainda estivessem inibindo de forma desconhecida a atividade hemolítica. Assim, era necessário demonstrar que o que estava sendo ligado aos lipossomos e removido do Ext-ms era o que diretamente causava a sua lise. Para isto, tentamos a seguinte abordagem: utilizamos os lipossomos que removeram a atividade lítica de Ext-ms, lavamos extensivamente essas vesículas para remover todas as moléculas do Ext-ms que não se ligaram aos mesmos e incubamos esses lipossomos com vesículas contendo calceína e que não haviam entrado em contato com Ext-ms. Nossa intenção era verificar se o contato entre os dois tipos de lipossomos causava a lise do que não havia entrado em contato direto com Ext-ms. Assim, verificamos que, de fato, foi o que ocorreu (Fig. 10). Isto indicou que, de alguma forma, possivelmente por fusão de membranas dos dois tipos de lipossomos, a leishporina ligada ao lipossomo sem calceína foi transferida para os lipossomos contendo calceína. A mesma quantidade de lipossomos não incubados previamente com Ext-ms não foi capaz de causar a liberação de calceína, mostrando que as moléculas ligadas à superfície dos lipossomos previamente incubados com Ext-ms eram necessárias e suficientes para a lise das vesículas.

### **3.3-Análise dos efeitos da ativação da leishporina.**

Sabíamos que duas formas da citolisina, uma ativa e outra inativa, co-existem nos extratos do parasita. Experimentos anteriores do nosso grupo mostraram que a leishporina é ativada por proteases ou em condições dissociantes e que esta ativação parece ocorrer pela remoção de um peptídeo inibidor não-covalentemente ligado à molécula inativa (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010).



**Figura 10 – Lise de lipossomos por contato com lipossomos que removeram a atividade hemolítica de Ext-ms.**

Lipossomos que removeram completamente a atividade hemolítica de Ext-ms foram lavados com PBS e em seguida incubados com lipossomos contendo calceína que não tinham entrado em contato prévio com o Ext-ms. Como controle, lipossomos que não entraram em contato com Ext-ms foram incubados com os lipossomos contendo calceína nas mesmas condições. A liberação de calceína foi medida em fluorímetro nos intervalos indicados.

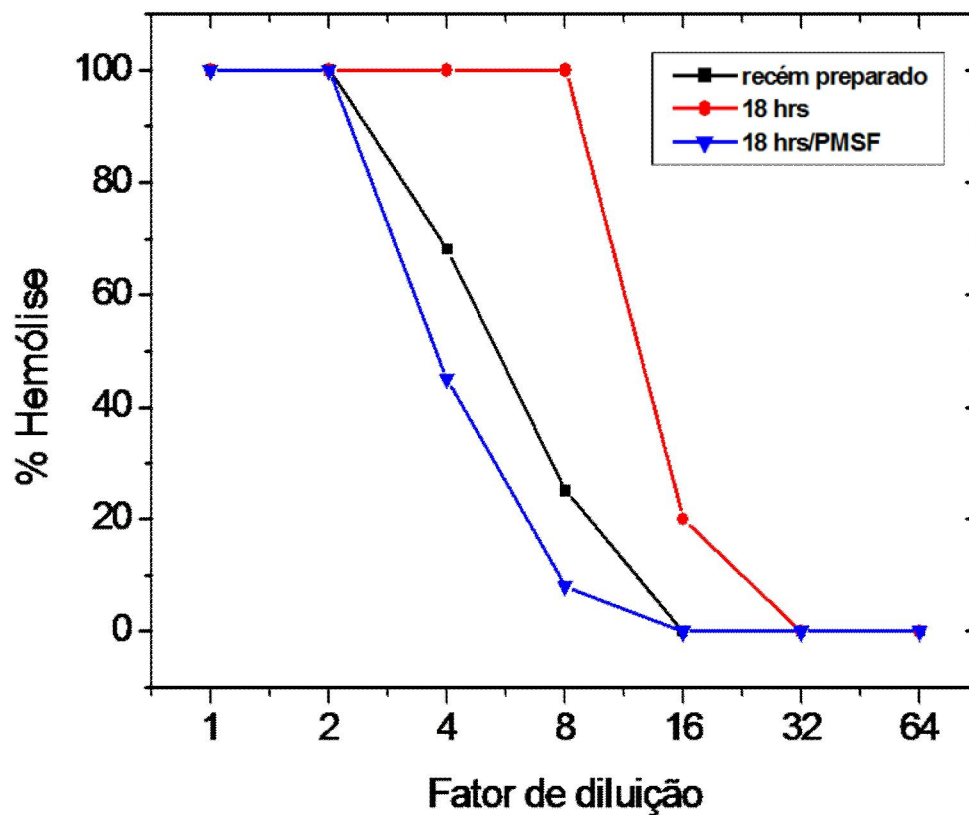


Assim, investigamos a ativação da leishporina por proteólise e por dissociação, na tentativa de melhor entender este mecanismo e seus efeitos.

### **3.3.1- Ativação proteolítica da leishporina por serino-proteases do Ext-ms.**

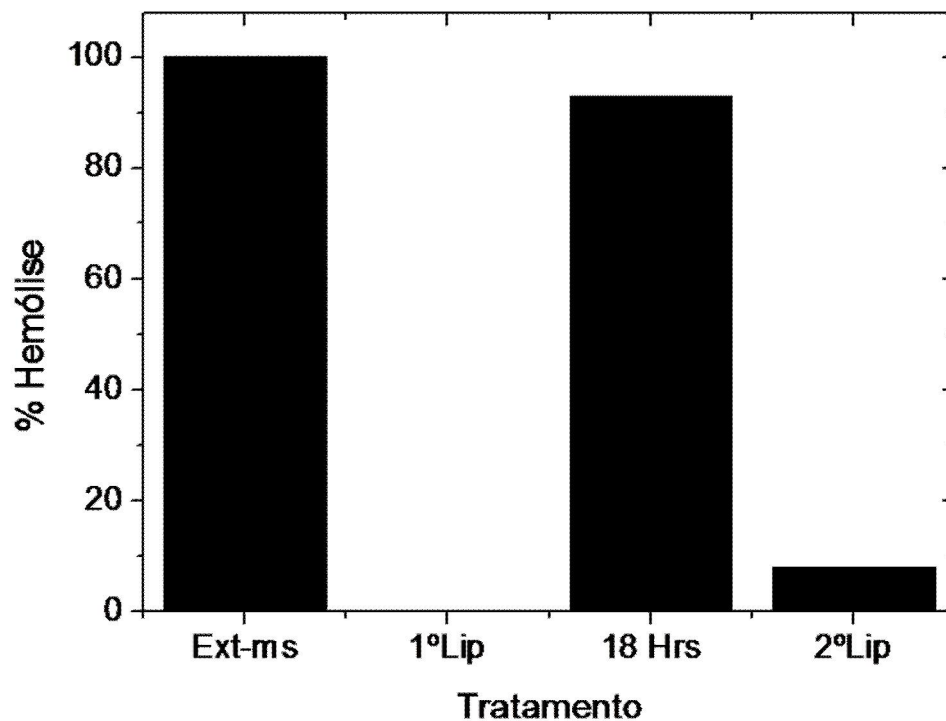
Em trabalhos anteriores, nosso grupo mostrou que a leishporina pode ser ativada por serino-proteases do próprio parasita ou por proteases exógenas, como Pronase e Proteinase K (Almeida-Campos & Horta, 2000; Almeida-Campos, 2001). Nesses trabalhos, foi verificado que, enquanto a leishporina encontrava-se na fração insolúvel, as proteases responsáveis pela sua ativação encontravam-se na fração solúvel do extrato do parasita. No presente trabalho, verificamos que a leishporina do Ext-ms (extrato rico em membranas, mas preparado de forma diferente da dos trabalhos anteriores) também é ativada quando este é incubado por 18 horas a 37 °C. Este aumento também é devido à ação de serino-proteases presentes no Ext-ms, uma vez que a ativação é inibida por PMSF (Fig. 11).

Resultados anteriores do nosso grupo já haviam mostrado que após a remoção de toda a atividade hemolítica de Ext-ms por lipossomos, ainda havia geração de nova atividade, se o mesmo fosse incubado com proteinase K ou tratado com agentes dissociantes (Almeida-Campos, 2001; Almeida Campos et al., 2010). Esses resultados nos sugeriram que formas inativas da leishporina não estavam sendo removidas pelos lipossomos, as quais eram então ativadas por proteólise ou por dissociação do inibidor, respectivamente. Também com o Ext-ms e os lipossomos aqui utilizados, verificamos que após a remoção de toda a atividade hemolítica do Ext-ms pelos lipossomos de DPPC, o sobrenadante inativo incubado a 37 °C por 18 horas apresenta nova atividade hemolítica, o que indica que o extrato ainda continha formas inativas da leishporina (Fig. 12). Esta nova atividade gerada também pode ser novamente removida por lipossomos, como observado na figura 12, o que sugeriu que ou a ativação da leishporina torna a molécula capaz de se ligar ao DPPC ou havia excesso de formas inativas em relação à quantidade de lipossomos utilizada. A análise das proteínas que se ligaram ao lipossomo está mostrada mais à frente, onde relatamos a tentativa de purificação da citolisina.



**Figura 11 – Efeito de PMSF na ativação da leishporina.**

Ext-ms foram ensaiados quanto à sua atividade hemolítica imediatamente após preparação ou após incubação na presença ou ausência de 10 mM do inibidor de serino-protease PMSF por 18 horas a 37° C. O controle de uma alíquota incubada com etanol, solvente utilizado para dissolver o PMSF, não inibiu a geração de atividade (não mostrado).



**Figura 12 – Ativação da leishporina em Ext-ms que teve atividade hemolítica removida por lipossomos.**

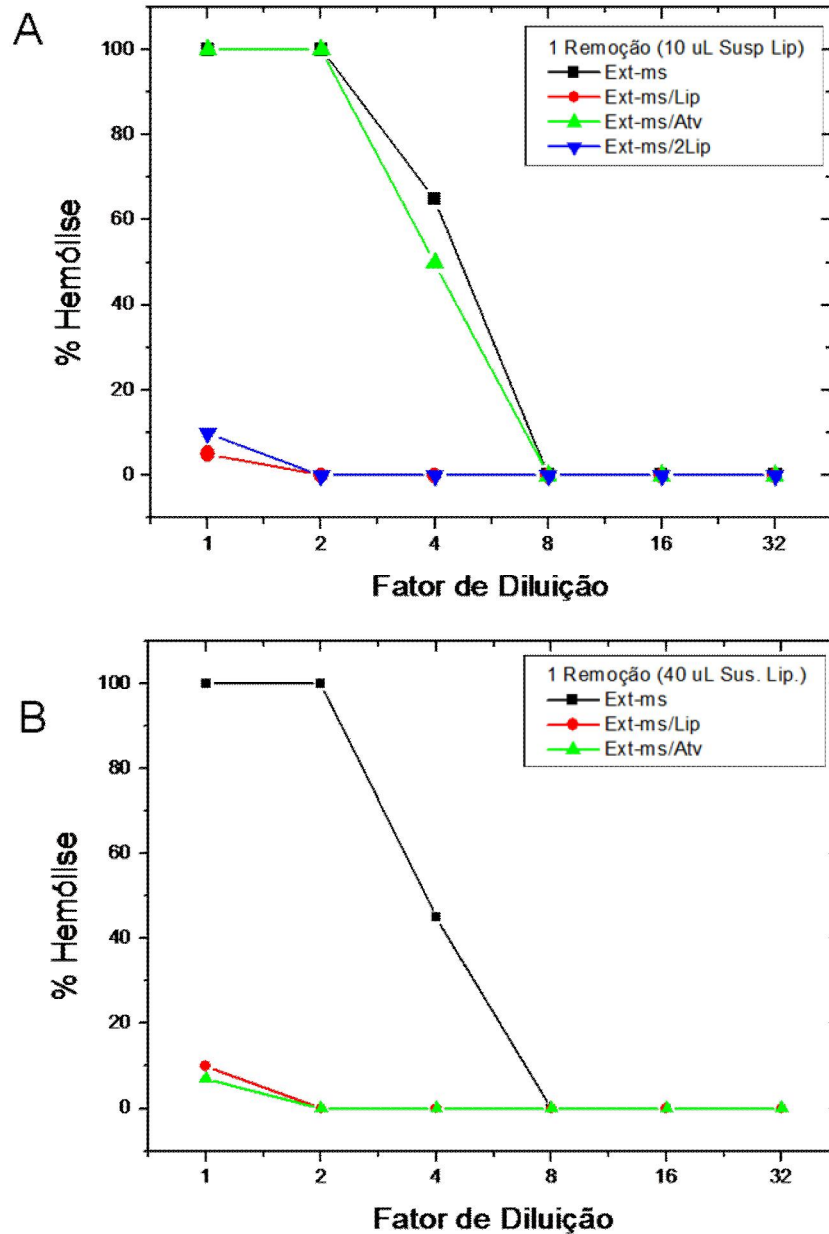
Ext-ms hemoliticamente inativo após remoção da atividade hemolítica com lipossomos (1ºLip) foi incubado a 37 °C por 18 horas. Após este período, a nova atividade hemolítica gerada era removida com a mesma quantidade de lipossomos utilizada na primeira remoção (2ºLip).

### **3.3.2- Determinação da forma da leishporina ativa/inativa capaz de se ligar a DPPC.**

Resultados anteriores indicavam que tanto a forma inativa quanto a forma ativa se ligam a DPPC (Almeida-Campos et al., 2010). Isto foi corroborado pelo experimento representado na figura 13, no qual removemos a atividade lítica de Ext-ms de duas formas: ou com a quantidade mínima de lipossomos que remove a atividade hemolítica (Fig. 13A) ou com um excesso de lipossomos (Fig. 13B), sabendo que no primeiro tratamento ainda restavam formas inativas no sobrenadante (Almeida-Campos et al., 2010), e esperando que o segundo tratamento favorecesse a ligação das formas inativas restantes aos lipossomos, caso isto acontecesse. Após a remoção dos lipossomos, os extratos tratados eram incubados overnight a 37 °C para permitir a ativação proteolítica da leishporina com proteases do próprio extrato (ver Fig. 11). No primeiro caso (Fig. 13A), verificamos que houve geração de atividade hemolítica nos extratos hemoliticamente inativos, enquanto que no segundo caso (Fig. 13B) isto não aconteceu. A atividade hemolítica gerada no primeiro experimento também é removida com lipossomos de DPPC. O fato de que Ext-ms tratado com quantidades menores de lipossomos ainda pode ser ativado demonstra que ainda há formas inativas da leishporina que não se ligam às vesículas durante a incubação com quantidades mínimas de lipossomos, mas ligam-se quando estes são apresentados em excesso. Esses dados, além de confirmarem resultados anteriores (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010), mostram claramente que as formas inativas também se ligam aos lipossomos e que realmente havia um excesso de formas inativas em relação à quantidade de lipossomos utilizada (Fig. 12 e 13A).

### **3.3.3- Diferença entre as formas ativas e inativas da leishporina.**

Embora esses resultados mostrem que ambas as formas ativas/inativas da citolisina são capazes de se ligar aos lipídeos, eles não informam se a capacidade de se ligar a lipídeos é igual ou diferente para as duas formas da citolisina. Para responder essa pergunta desenhamos um experimento no qual inicialmente removemos a atividade lítica com a quantidade mínima para que toda atividade hemolítica fosse removida, deixando assim o extrato com uma quantidade máxima possível de formas inativas. Com esses extratos realizamos um experimento utilizando dois protocolos diferentes de



**Figura 13 – Determinação da forma (ativa/inativa) da leishporina capaz de se ligar às membranas.**

Ext-ms foi incubado com 10  $\mu$ L (A) ou 40  $\mu$ L (B) da suspensão de lipossomos (Ext-ms/Lip). Depois de sedimentados os lipossomos, os sobrenadantes foram ensaiados quanto à sua atividade hemolítica. Uma alíquota idêntica de Ext-ms incubada a 37° C *overnight* (Ext-ms/Atv) (tratamento que ativa a leishporina por ação de proteases endógenas). A atividade hemolítica foi verificada pelo ensaio hemolítico e foi novamente removida com lipossomos (Ext-ms/2Lip).

incubação com 500 mM de cloreto de guanidina (g-HCl), como agente dissociante que, sabidamente, ativa imediatamente as formas inativas da leishporina (Fig. 14A). No primeiro, incubamos com o g-HCl o Ext-ms contendo apenas as formas inativas antes da incubação com hemácias. Incubamos então o Ext-ms ativado com as hemácias (por 1, 2, 5, 8 e 10 min). As células eram então sedimentadas, ressuspensas para o volume inicial em tampão de lise e o ensaio hemolítico era realizado. No segundo protocolo, a mesma amostra de Ext-ms contendo apenas as formas inativas foi incubada primeiramente com hemácias no gelo, pelos mesmos intervalos de tempo, já sabendo que as formas inativas se ligariam a essas membranas nessas condições. Em seguida, lavamos as células, as ressuspensas para o volume original e a ativação foi então realizada depois de as formas inativas terem se ligado às hemácias. Os resultados expressos na figura 14A mostraram que a ativação da citolisina aumenta a velocidade de sua ligação às hemácias, o que indica que a ativação da citolisina faz aumentar a sua capacidade de se ligar ao seu ligante lipídico na membrana-alvo. Neste experimento (Fig 14A), avaliamos a atividade lítica apenas em um ponto, ao final de 30 minutos de ensaio. Em outro experimento simultâneo (Fig. 14B), avaliamos as diferenças na cinética de lise entre os dois tipos de tratamentos escolhendo um determinado tempo de incubação do Ext-ms com hemácias do experimento anterior (escolhemos o tempo de 8 minutos) e acompanhamos a lise durante 60 minutos de incubação a 37°C nos intervalos indicados. Como pode ser verificado, os extratos que foram ativados com o agente dissociante após a ligação da citolisina lisam muito mais lentamente do que aqueles previamente tratados com o agente dissociante, os quais, em apenas 5 minutos, atingem quase a mesma porcentagem de lise que os primeiros gastam 60 minutos para atingir (Fig. 14B). Este resultado reforça a interpretação do resultado anterior.

### **3.4- Análise das membranas lisadas pela leishporina por microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy - AFM).**

#### **3.4.1- Visualização de estruturas pore-like na superfície de hemácias e lipossomos.**

A formação de poros pela leishporina já foi demonstrada pelo nosso grupo utilizando a técnica de *patch-clamp* (Noronha et al., 2000). No entanto, os poros

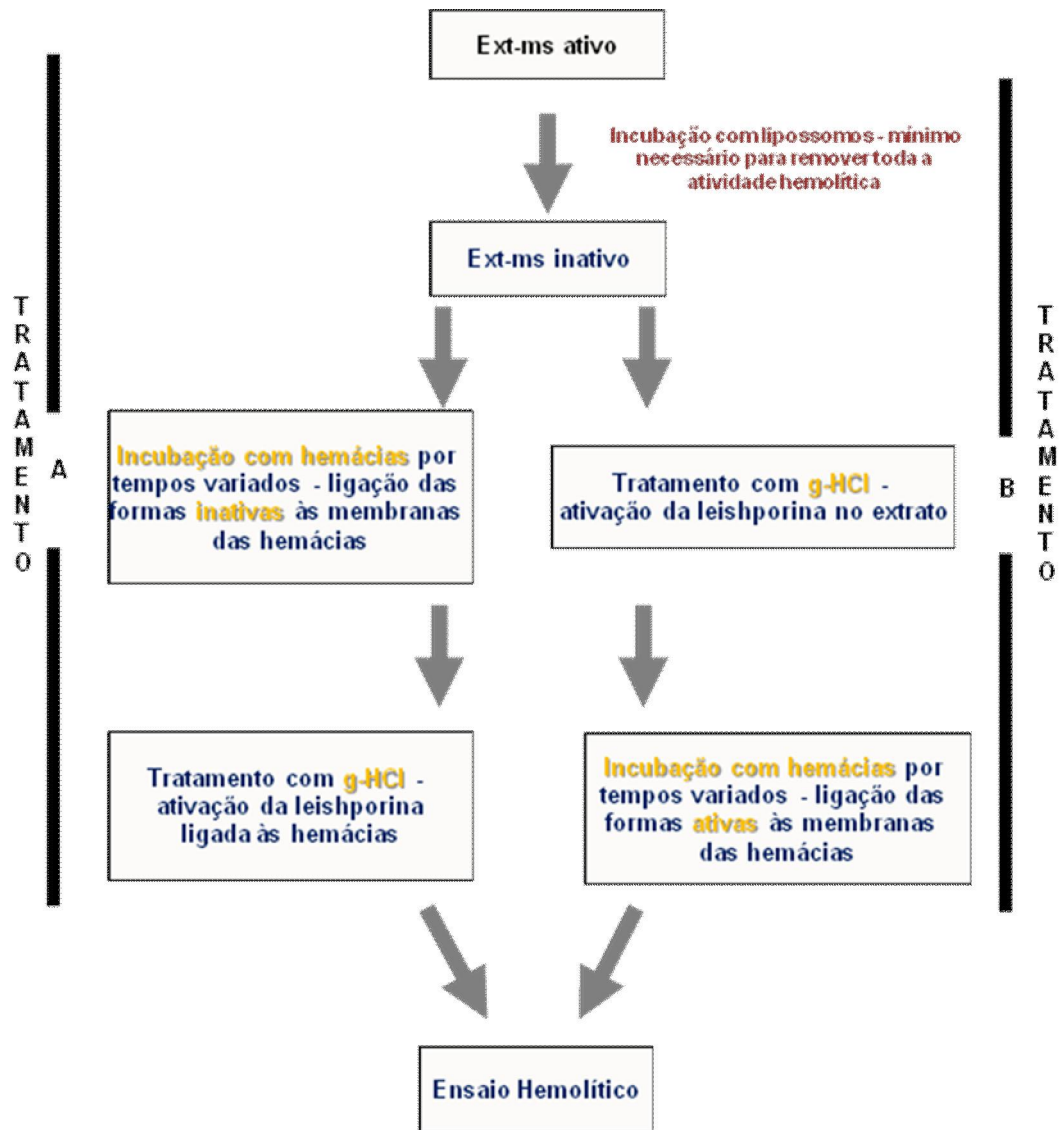
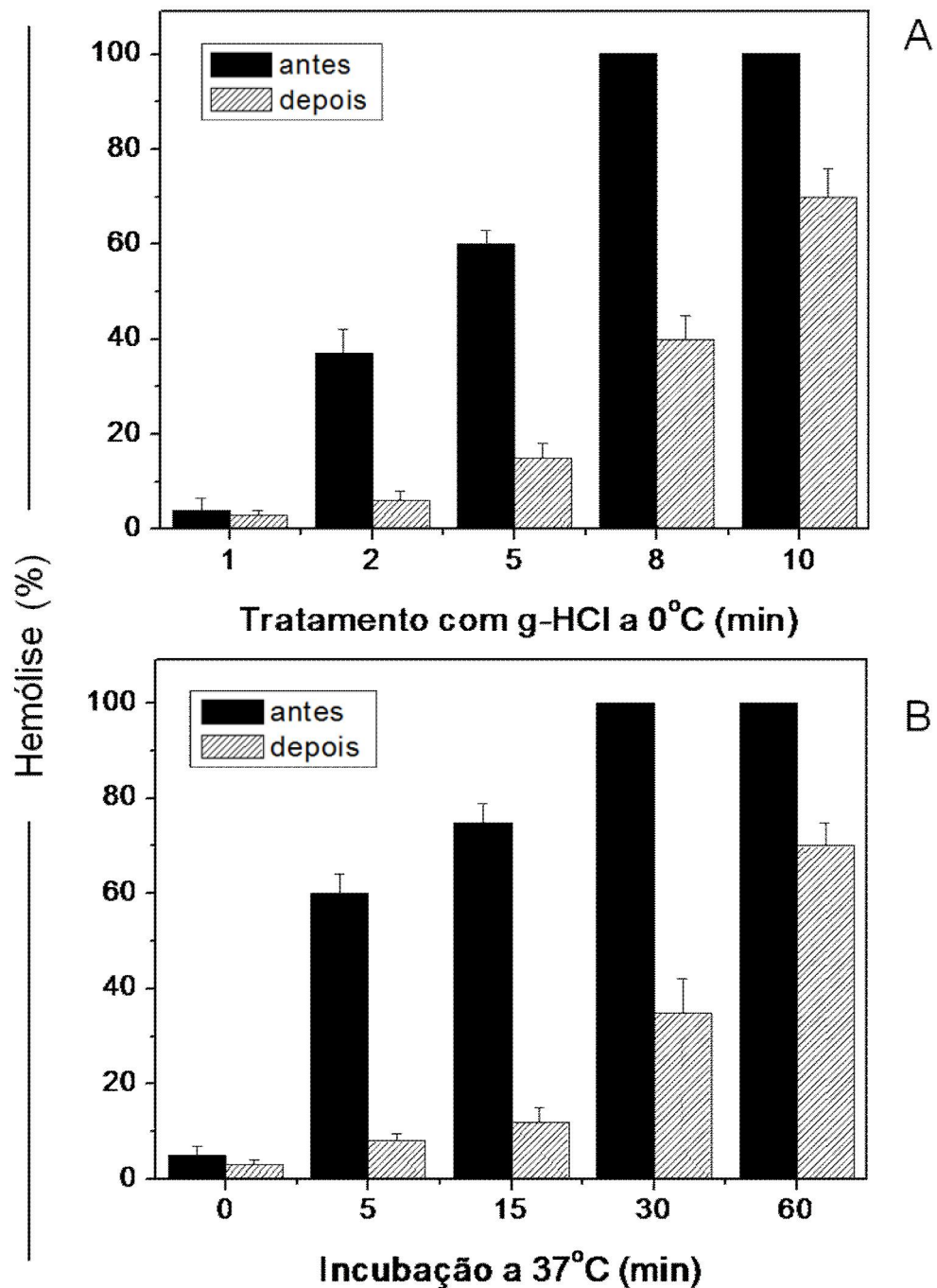


Figura 14A – Esquema Experimental - Cinética de ligação da leishporina ativa e inativa na superfície de hemácias (Fig 14B).

Ext-ms foram incubados com o mínimo necessário de lipossomos para remover toda a atividade lítica. Os Ext-ms hemoliticamente inativos eram incubados com hemácias por períodos variáveis antes ou após adição do agente dissociante ativador g-HCl (500 mM) a 0°C. Seguiu-se então o ensaio hemolítico.



**Figura 14B – Cinética de ligação da leishporina ativa e inativa na superfície de hemácias.**

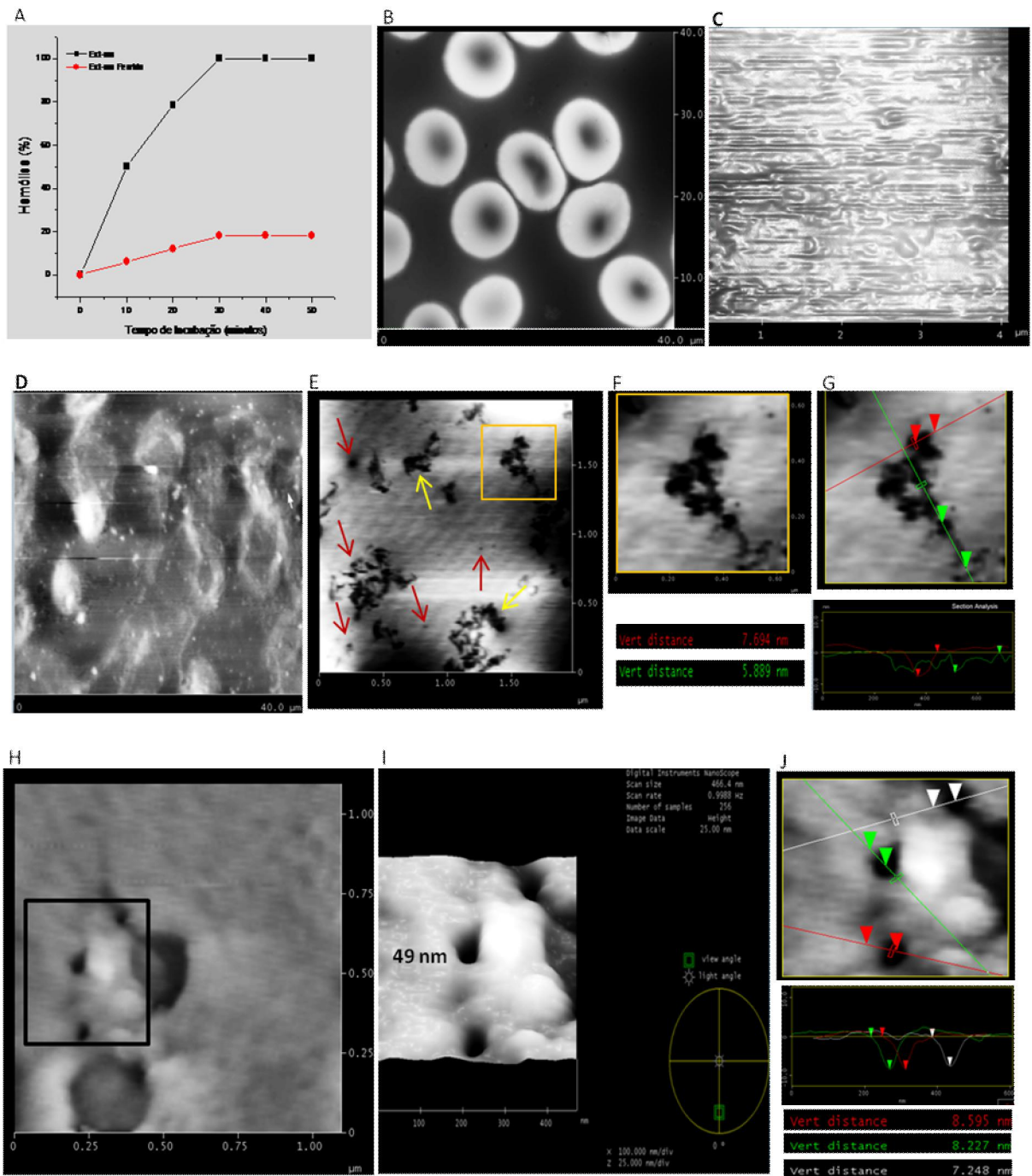
Ext-ms foram incubados com o mínimo necessário de lipossomos para remover toda a atividade lítica. Os Ext-ms hemoliticamente inativos eram incubados com hemácias por períodos variáveis antes ou após adição de 500 mM g-HCl a 0°C. A hemólise era então determinada a 37 °C após 30 minutos de incubação (A) ou após os tempos indicados (B) (apenas para o ponto de 8 minutos do experimento representado em A).



formados pela leishporina ainda não tinham sido visualizados diretamente. Na tentativa de visualizar os poros formados pela leishporina, utilizamos a AFM em *Tapping Mode-AFM*, escaneando tanto a superfície de hemácias lisadas por Ext-ms quanto filmes lipídicos feitos a partir de lipossomos carregados com a citolisina após sucessivas incubações com Ext-ms. Esta abordagem nos permitiu visualizar formas bem definidas e de características homogêneas que se assemelham a poros. As hemácias intactas, com sua concavidade típica, puderam ser visualizadas e estão mostradas na figura 15B. A análise de hemácias íntegras mostra uma superfície irregular, mas homogênea, em todos os campos analisados (Fig 15C), não apresentando nenhuma estrutura que evidencia lesão. Na preparação de hemácias lisadas por Ext-ms (Fig. 15A), detectamos inicialmente a presença dos *ghosts* característicos da célula lisada, com seu invólucro celular perfeitamente detectável (Fig. 15D). A análise de varredura da superfície dos *ghosts* mostrou a presença de várias estruturas em forma de poros de vários tamanhos em diferentes experimentos e em vários campos analisados análises (imagens típicas, Fig. 15E-J). Na figura 15E, observamos estruturas circulares, como poros individuais (setas vermelhas), bem como estruturas que se assemelham a poros em coalescência (dois ou vários), formando orifícios maiores, mas sempre com as bordas arredondadas reminiscentes de uma estrutura circular original (setas amarelas e em destaque). A análise topográfica tanto das estruturas em forma de poros individuais como das coalescências mostra uma espessura (distância vertical) que varia de cerca de 5,9, a 8,6 nm, medidas compatíveis com a espessura da bicamada lipídica celular de ~ 7 nm. Os diâmetros das estruturas *pore-like* circulares variaram de 25-100 nm.

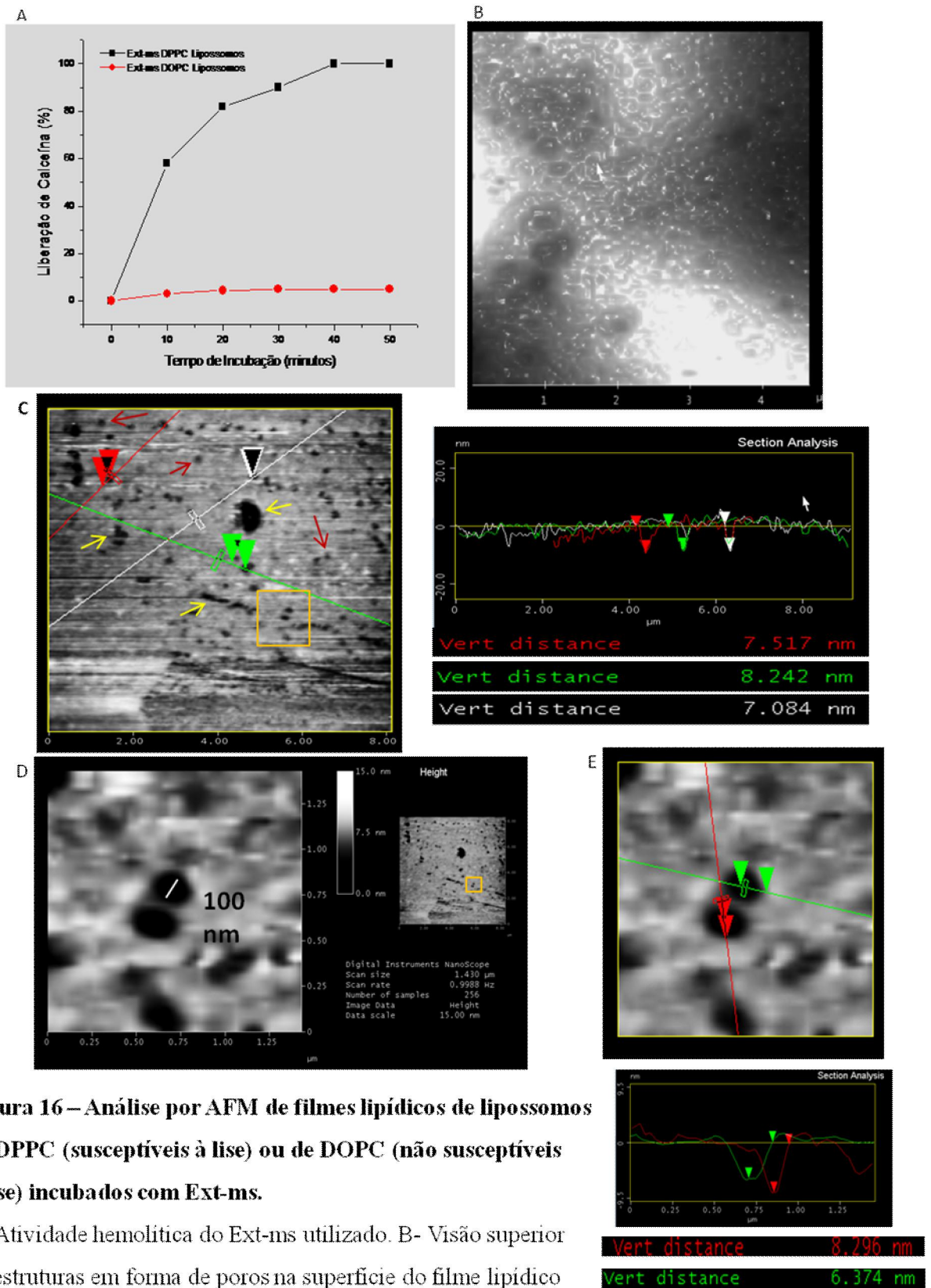
Outro modelo de membrana atualmente muito utilizado em AFM para se estudar a interação de proteínas com biomembranas é o de lipossomos planarizados em filmes lipídicos. Utilizamos esta estratégia e os perfis topográficos observados podem ser vistos nas figuras 16, 17 e 18. Utilizamos dois tipos de controles negativos: 1) lipossomos de DOPC incubados com Ext-ms hemoliticamente ativos, lembrando que estes lipossomos não são lisados pela citolisina (Fig. 16A) e permanecem estáveis mesmo por semanas na presença de Ext-ms (resultados não mostrados) e 2) lipossomos de DPPC incubados com Ext-ms inativados pelo calor, que tampouco são lisados, como já mencionado e como ser visto na figura (Fig 17 A).

A análise da estrutura do filme lipídico obtido de lipossomos intactos de DPPC (Fig. 16) e DOPC (Fig. 17) também mostra uma superfície irregular, mas homogênea, e



**Figura 15 – Análise por AFM de hemácias lisadas por Ext-ms.**

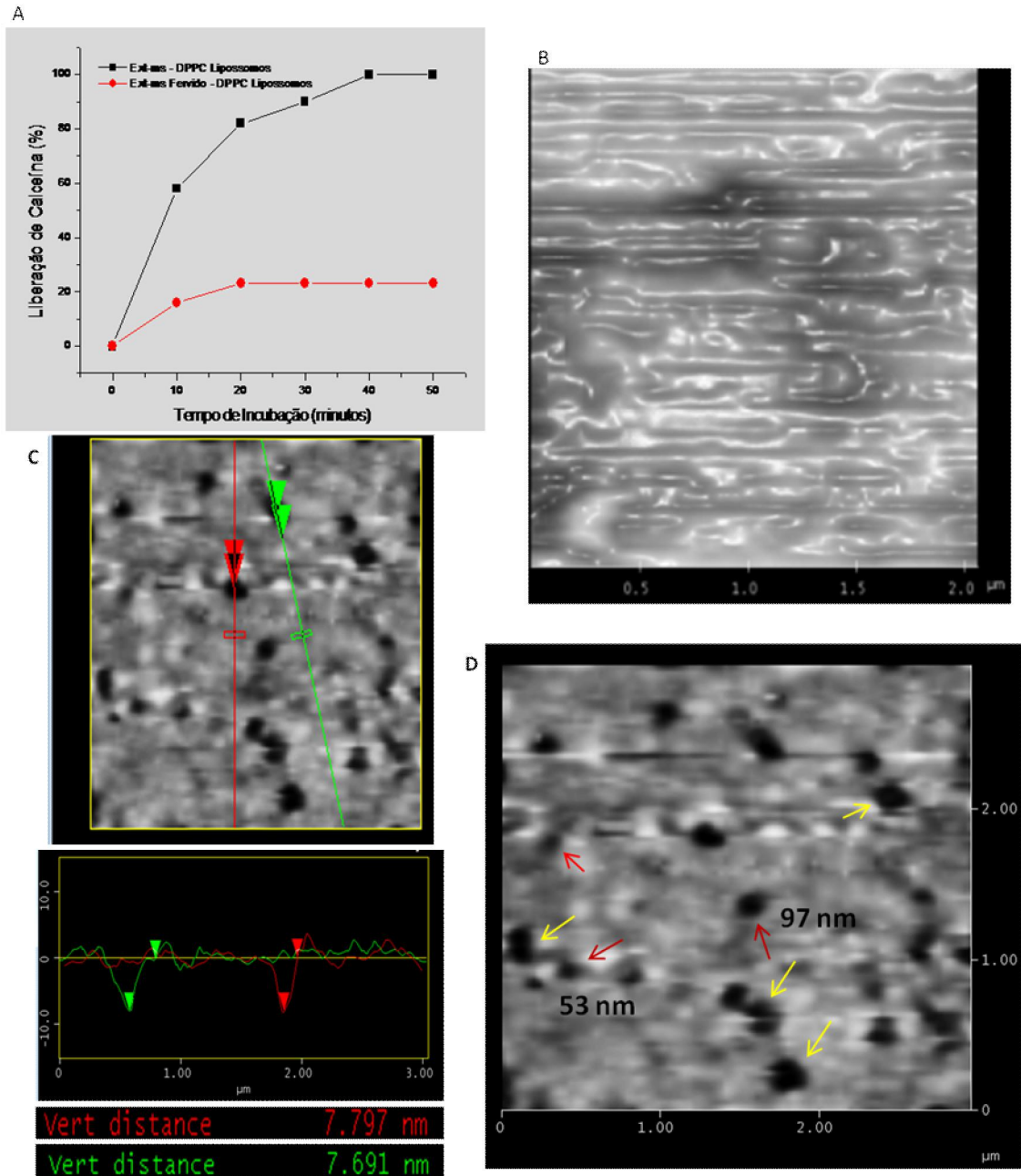
A- Atividade hemolítica do Ext-ms utilizado. B- Hemácias íntegras. C- Membrana celular de hemácia íntegra. D- Hemácias lisadas pelo extrato do parasita (*ghosts*) E- Membrana celular de hemácia lisada por Ext-ms. F a H - Zoom e análises topográficas das lesões em forma de poro. I – Vista lateral em 3D do detalhe em H. Setas vermelhas - estruturas circulares; setas amarelas - estruturas em coalescência.



**Figura 16 – Análise por AFM de filmes lipídicos de lipossomos de DPPC (susceptíveis à lise) ou de DOPC (não susceptíveis à lise) incubados com Ext-ms.**

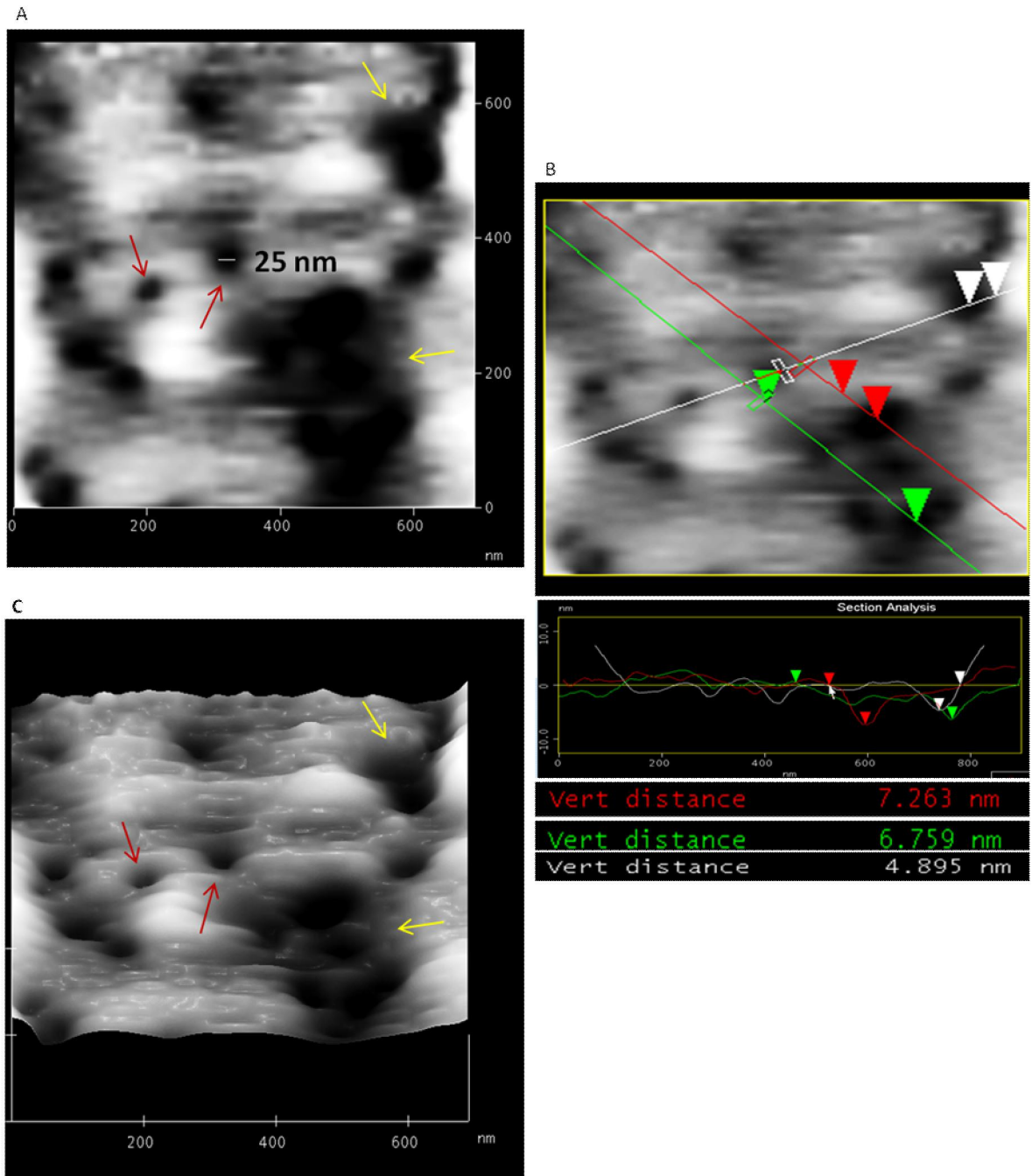
A- Atividade hemolítica do Ext-ms utilizado. B- Visão superior de estruturas em forma de poros na superfície do filme lipídico de lipossomos lisados por Ext-ms. C- Filme lipídico de lipossomos de DOPC. D- Detalhe de duas estruturas semelhantes a poros em visão superior com diâmetro assinalado. E- Análise topográfica das estruturas *pore-like*. Setas vermelhas - estruturas circulares; setas amarelas - estruturas em coalescência.

A- Atividade hemolítica do Ext-ms utilizado. B- Visão superior de estruturas em forma de poros na superfície do filme lipídico de lipossomos lisados por Ext-ms. C- Filme lipídico de lipossomos de DOPC. D- Detalhe de duas estruturas semelhantes a poros em visão superior com diâmetro assinalado. E- Análise topográfica das estruturas *pore-like*. Setas vermelhas - estruturas circulares; setas amarelas - estruturas em coalescência.



**Figura 17 – Análise por AFM de filmes lipídicos de lipossomos de DPPC incubados com Ext-ms recém preparados ou desnaturados pelo calor.**

A- Atividade hemolítica do Ext-ms utilizado, recém preparado ou inativado pelo calor. B- Visão superior da superfície do filme lipídico de lipossomos lisados por Ext-ms inativado pelo calor; C - Análise topográfica de duas estruturas em forma de poros. D - Vista superior mostrando em maior detalhe estruturas de diâmetros distintos (~97 e 53 nm) Setas vermelhas - estruturas circulares; setas amarelas - estruturas em coalescência.



**Figura 18 – Análise por AFM de filmes lipídicos de lipossomos de DPPC lisados por Ext-ms (análise em maior aumento do filme lipídico do experimento anterior (vide escalas).**

A- Vista superior do filme lipídico feito com lipossomos de DPPC lisados por Ext-ms; B- Análise topográfica de três estruturas em forma de poros; C- Vista lateral em 3-D do filme lipídico. Setas vermelhas - estruturas circulares; setas amarelas - estruturas em coalescência.

sem lesões aparentes. Ao contrário, no entanto, os filmes lipídicos provenientes de lipossomos de DPPC lisados (Fig. 16 A) apresentam o mesmo tipo de estrutura em forma de poros induzidas pelos extratos do parasita observado nas hemácias (Fig. 16 C e 17 C e 18). Mais uma vez, verificamos uma população heterogênea de lesões em forma de poros, com diâmetros de tamanhos variados semelhantes aos encontrados nas hemácias (12-100 nm), mas com uma prevalência de estruturas medindo ~50 e ~100 nm (Figs. 16C, D e E, 17C e D). Também como nas hemácias, as formações eram visualizadas tanto como estruturas *pore-like* isoladas, de forma circular (setas vermelhas), quanto como o que se assemelhava a poros em fusão (setas amarelas). A observação de estruturas *pore-like* em quase-fusão (Fig. 16 C e D, em destaque, e 17D) é um indicativo de que isto possa, de fato, ocorrer. A medida da espessura das lesões *pore-like* na membrana, que variou de 6,4 a 8,3 nm, mostrou novamente coerência com a espessura de bicamadas lipídicas celulares, medida esta observada para todas as estruturas visualizadas e mostrada na figura para duas delas escolhidas ao acaso (Fig. 16 D e E). Ainda que trabalhando já perto do limite permitido por nossa sonda (cuja curvatura nominal era de 5 nm), tentamos visualizar a presença de estruturas *pore-like* ainda menores e conseguimos, nesta mesma amostra, detectar a presença de pequenos poros medindo cerca de 12 nm de diâmetro (Fig. 18A e B) e 6 nm de profundidade (não mostrado). Na figura 18C observa-se uma visão lateral do filme lipídico em 3D, onde é mais fácil observar que parece ocorrer realmente uma fusão ou confluência dessas estruturas nesta preparação, o que pode ter culminado com a existência de estruturas de tamanhos variados. A figura 18B mostra ainda a análise da topografia de algumas lesões observadas, como feito para as demais análises.

A ausência dessas estruturas em várias imagens analisadas nos controles que não são lisados indica que elas são o resultado direto da ação da citolisina nessas membranas.

Imagens suplementares de microscopia de força atômica de outros filmes lipídicos e de hemácias analisadas podem ser encontradas no anexo de imagens de AFM.

### **3.5-Purificação da leishporina a partir de Ext-ms.**

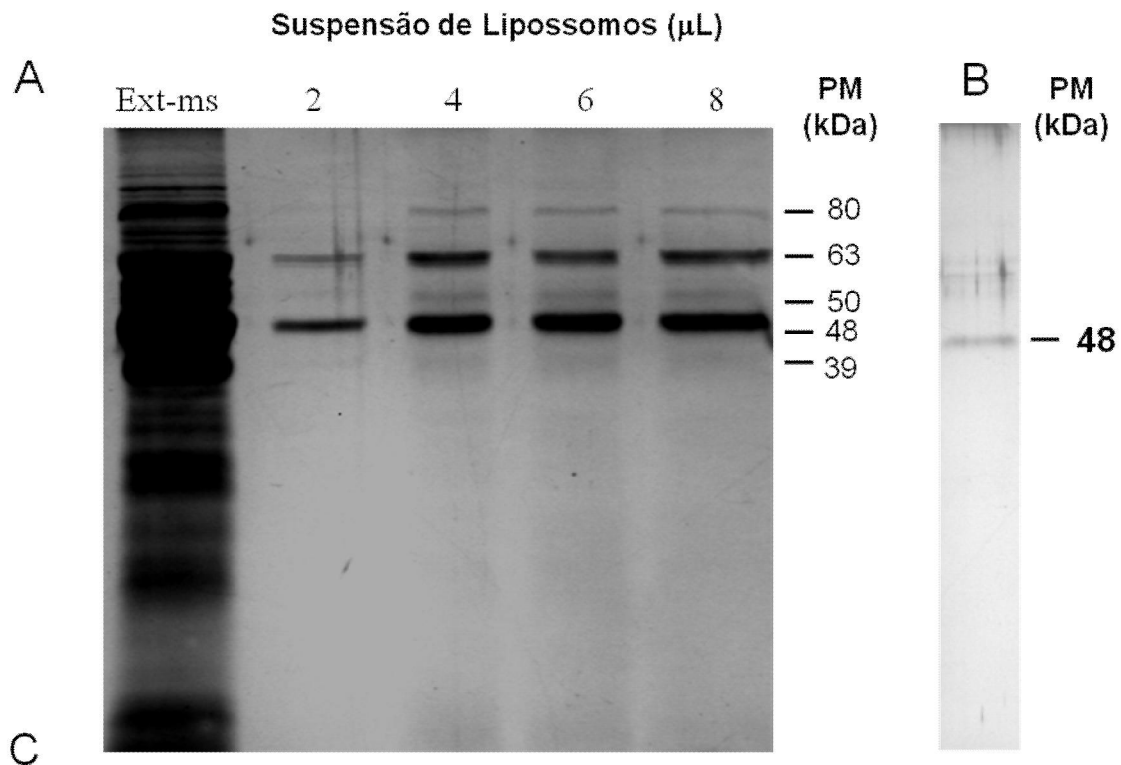
#### **3.5.1- Por remoção seletiva das moléculas co-removidas com a atividade lítica por lipossomos.**

##### **3.5.1.1-Análise das moléculas de Ext-ms co-removidas com a atividade hemolítica por lipossomos.**

O fato de sabermos que a leishporina se liga diretamente aos lipídios dos lipossomos levou-nos ao experimento óbvio de identificar as moléculas que se ligaram às vesículas. Assim, na tentativa de recuperar essas moléculas das membranas dos lipossomos e tentar visualizá-las por eletroforese, incubamos Ext-ms com quantidades crescentes de lipossomos, verificando a ausência da atividade lítica no sobrenadante para nos certificarmos da remoção da citolisina. Os lipossomos eram lavados e então preparados para análise em SDS-PAGE. Dessa forma, foi possível visualizar 5 bandas protéicas, com os PMs de cerca de 39, 48, 50, 63 e 80 kDa (Fig. 19A). Nas concentrações de Ext-ms utilizadas, não foi possível visualizar proteínas de PM abaixo de 39 kDa. Vale notar que a menor quantidade de lipossomos utilizada foi suficiente para remover toda a atividade hemolítica do Ext-ms. No entanto, ainda é possível que possa haver outras moléculas que, por estarem em baixa concentração não estejam sendo visualizadas nesta abordagem.

##### **3.5.1.2-Identificação por espectrometria de massas das proteínas co-removidas com a atividade hemolítica de Ext-ms por lipossomos.**

Os peptídeos trípticos das proteínas obtidas da eletroforese anterior foram analisados por espectrometria de massa em módulo MALDI-Tof-Tof. Essa abordagem nos permitiu identificar as proteínas pelo seu *fingerprint*, pelas massas dos peptídeos gerados e também pelo alinhamento de alguns peptídeos sequenciados de cada proteína com proteínas depositadas em bancos de dados, dando assim confiabilidade total às nossas identificações. Sendo assim, a proteína de 63 kDa foi identificada como sendo a abundante proteína de superfície conhecida como gp63, a de 50 kDa como sendo a beta-



Peso Molecular (kDa)	Proteína / Identidade	Organismo do banco de dados
80	não identificada	
63	gp63	<i>L. amazonensis</i>
50	$\beta$ -Tubulina	<i>L. major</i>
48	gp-46	<i>L. amazonensis</i>
39	GAPDH	<i>L. mexicana</i>

**Figura 19 – Perfil eletroforético e identificação das proteínas co-removidas com a atividade hemolítica de Ext-ms pelos lipossomos.** **A** - 10  $\mu\text{L}$  de Ext-ms foram incubados com as quantidades indicadas da suspensão de lipossomos que foram, em seguida, sedimentados. O sobrenadante foi ensaiado para verificação da remoção da atividade hemolítica. Após lavagem, os lipossomos foram preparadas em condições desnaturantes e redutoras e aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5%. Na primeira canaleta foi aplicada apenas a amostra preparada com 10  $\mu\text{L}$  de Ext-ms. **B** - Os lipossomos utilizados para remover a nova atividade gerada no experimento da figura 12 (2<sup>o</sup>Lip) foram lavados e a amostra para eletroforese foi preparada nas mesmas condições anteriores. **C** - (**Tabela 2**) - As proteínas co-removidas com a atividade hemolítica (A) foram tripsinizadas e os peptídeos resultantes purificados e analisados por espectrometria de massa. Peptídeos de cada uma dessas amostras foram seqüenciados (módulo MALDI-Tof-Tof) e a identificação é resultante de 100% de identidade dos peptídeos seqüenciados com proteínas depositadas no banco de dados.



tubulina (PM predito: 50,0 kDa), a de ~48 kDa como sendo a abundante proteína gp46 e a de ~39 kDa como sendo a enzima da via glicolítica gliceraldeído,3-P-desidrogenase (GAPDH) (PM predito: 35,8 kDa), todas identificadas em espécies do gênero *Leishmania* (Fig. 19C). A proteína de 80 kDa ainda não foi identificada.

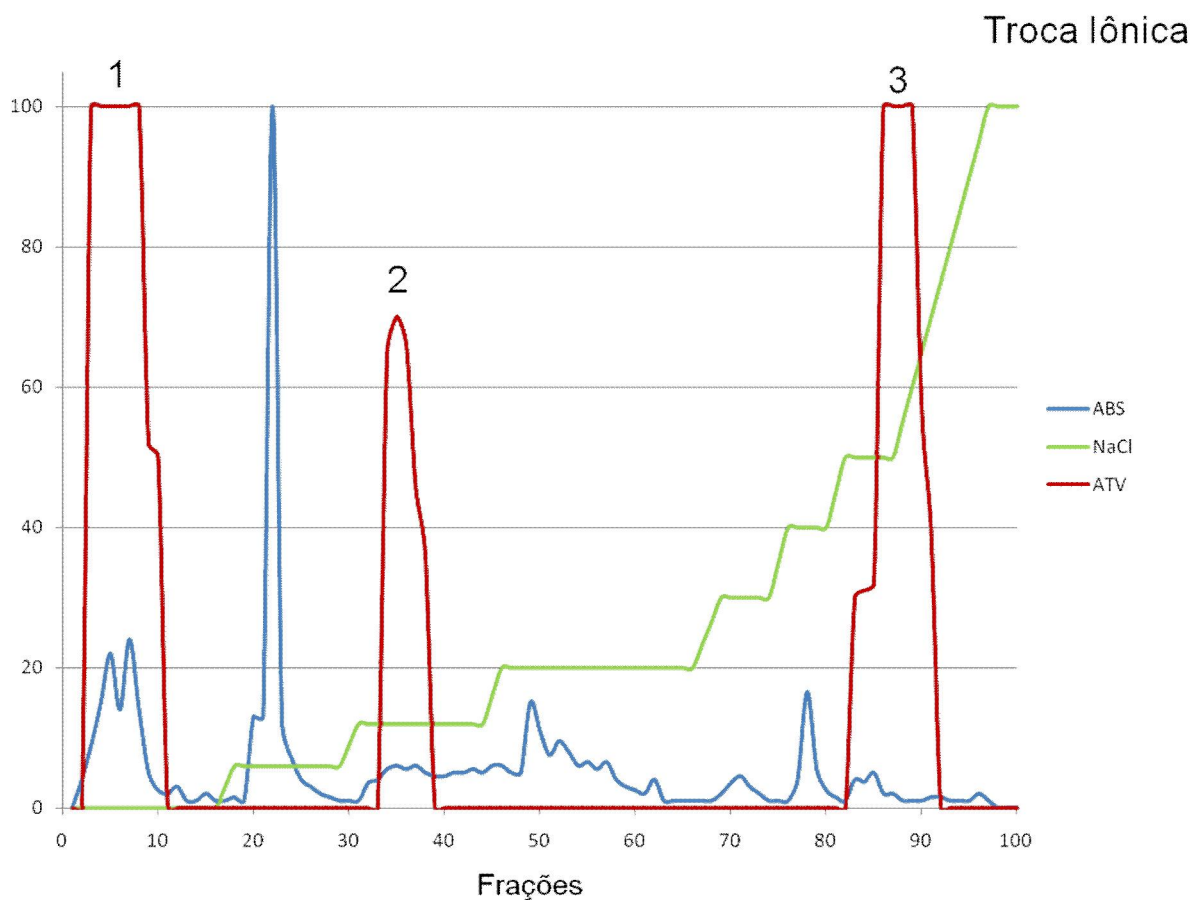
### **3.5.1.3- Perfil eletroforético de proteínas que se ligaram aos lipossomos após a re-ativação de Ext-ms hemoliticamente inativo.**

Nosso grupo mostrou anteriormente (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos, 2010), e confirmamos neste trabalho (Fig. 12), que Ext-ms que tem sua atividade inicial removida por lipossomos pode ser ativado por proteólise ou por agentes dissociantes. Além disso, mostramos também que a nova atividade gerada também pode ser removida por lipossomos. Nesse contexto, e para eliminar a possibilidade de que algumas das proteínas identificadas no experimento estivessem se ligando “inespecificamente” ao DPPC, o próximo passo foi remover a atividade inicial com lipossomos (e com ela, o que estivesse se ligando “inespecificamente”), ativar o extrato (como na figura 12) e verificar se nos lipossomos que removeram a atividade pela segunda vez poderia haver apenas a forma ativa da leishporina. Assim, após SDS-PAGE desses lipossomos, verificamos a presença de uma banda protéica com massa próxima de 48 kDa, também co-removida com a atividade hemolítica gerada (Fig. 19B). No entanto, esta banda não foi ainda identificada. É possível que ela seja a gp46, identificada no experimento anterior.

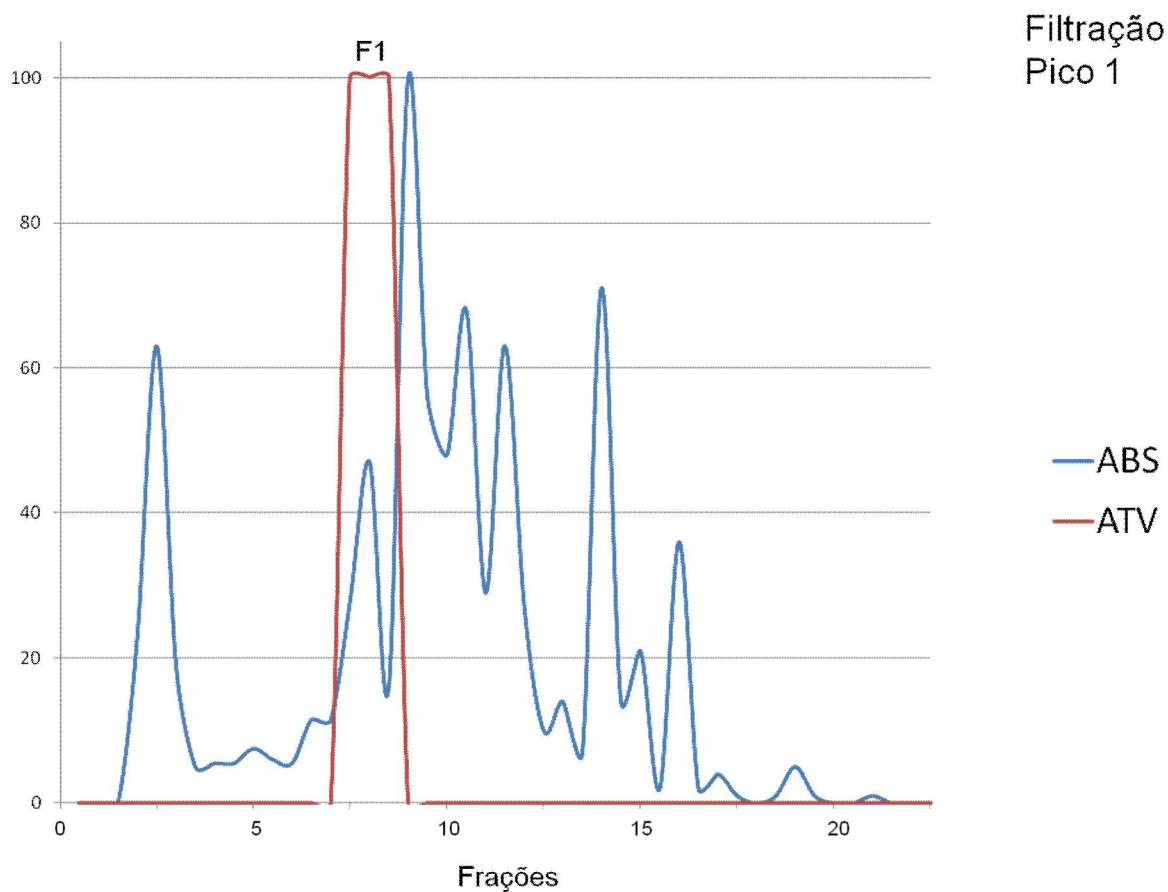
### **3.5.2- Por cromatografia líquida em FPLC e HPLC.**

#### **3.5.2.1- Cromatografias utilizando Ext-ms.**

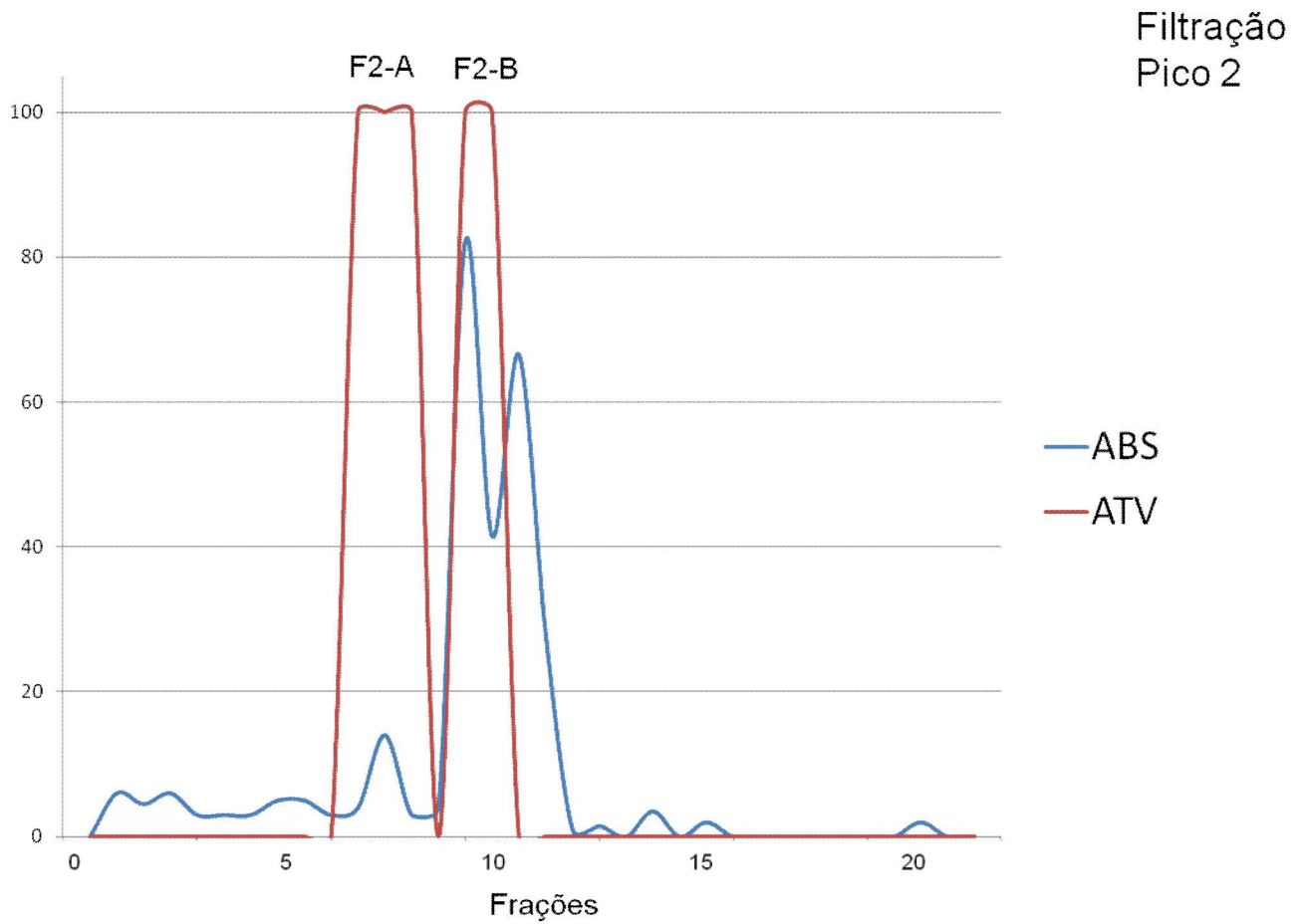
Ainda na tentativa de purificarmos a citolisina, recorremos, simultaneamente, a três técnicas clássicas de cromatografia: Troca Iônica em FPLC em coluna Resource-Q (Fig 20), seguida de Filtração Molecular em coluna Superose 12 (Figs. 20 a 23) e finalmente Fase Reversa em HPLC em coluna C18 (Fig 24 a 28). Após a cromatografia de troca iônica a atividade hemolítica separava-se em três frações distintas (Fig 20). As frações correspondentes ao primeiro pico de atividade eram re-cromatografadas na mesma resina, para eliminar a possibilidade de que essas moléculas



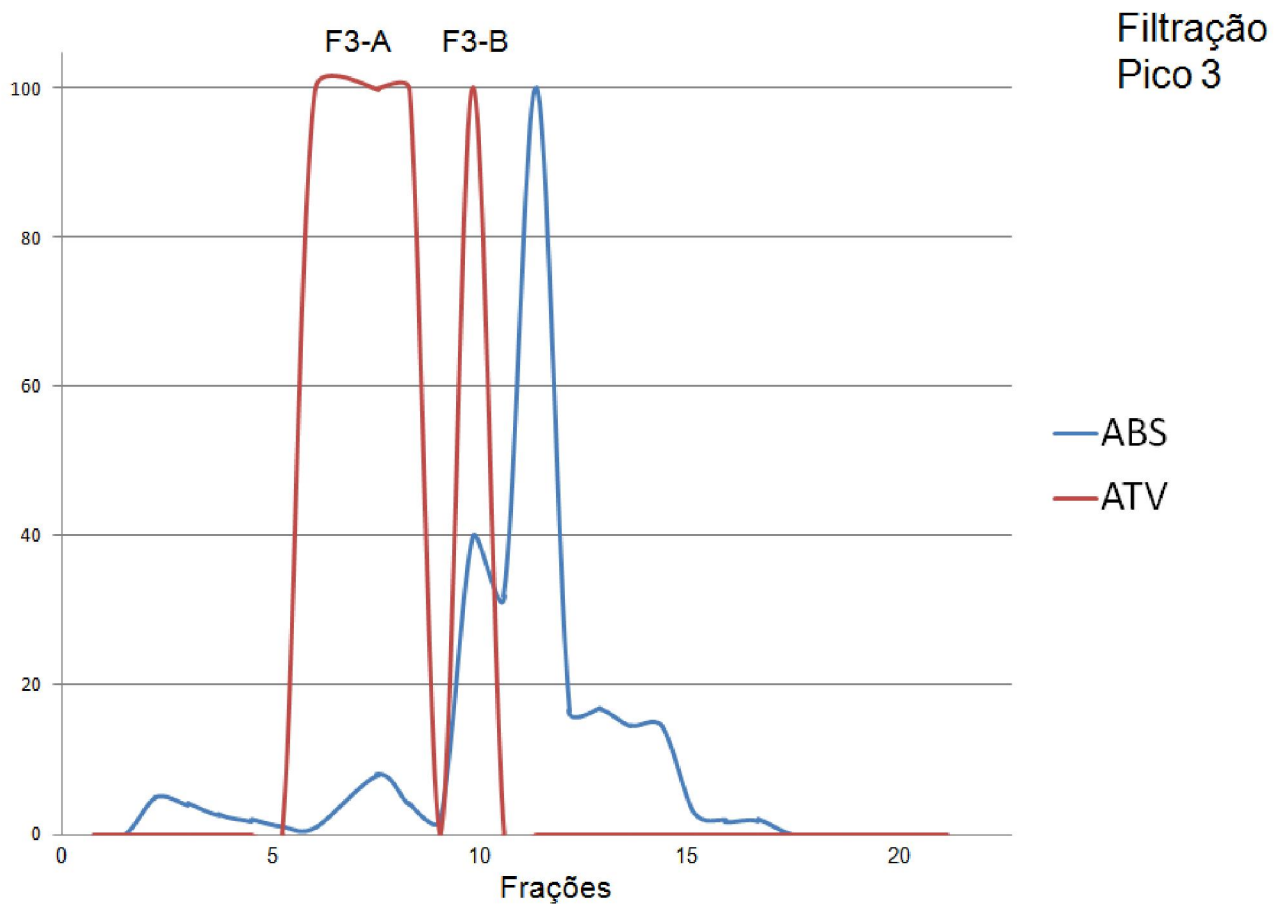
**Figura 20– Cromatografia de Troca Iônica (Resource-Q)-** Fluxo de 30 mL/h com retenção do gradiente nos patamares indicados. Em vermelho atividade hemolítica (% de lise), em azul, absorvância (280 nm) e em verde o gradiente de NaCl (de 0 a 1mM NaCl).



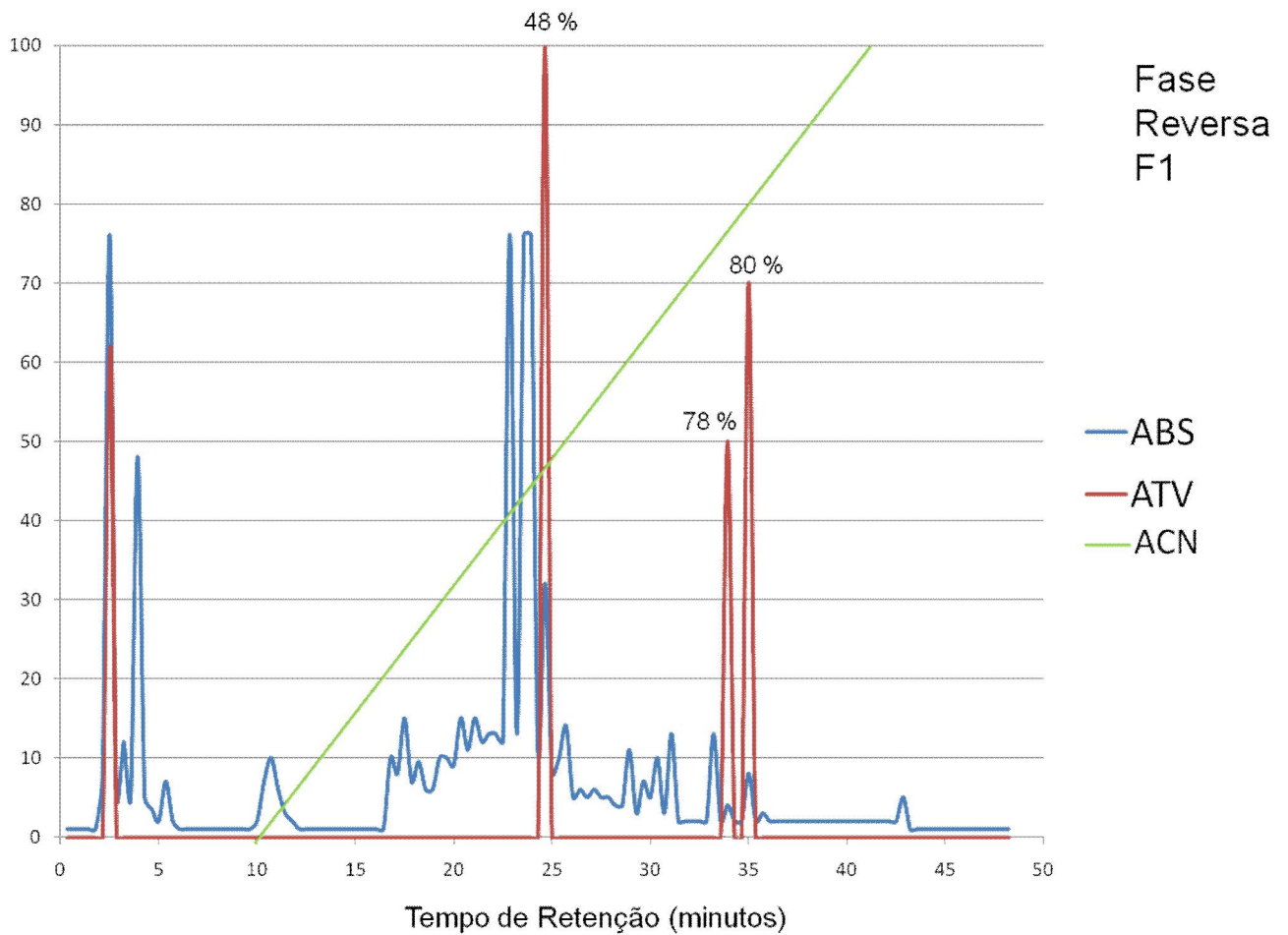
**Figura 21 – Cromatografia de Filtração Molecular / Superose 12 - Pico 1** – Fluxo de 30 mL/h, eluição em tampão borato 50 mM 0,4 % CHAPS. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise) e em azul (ABS) absorvância (280 nm).



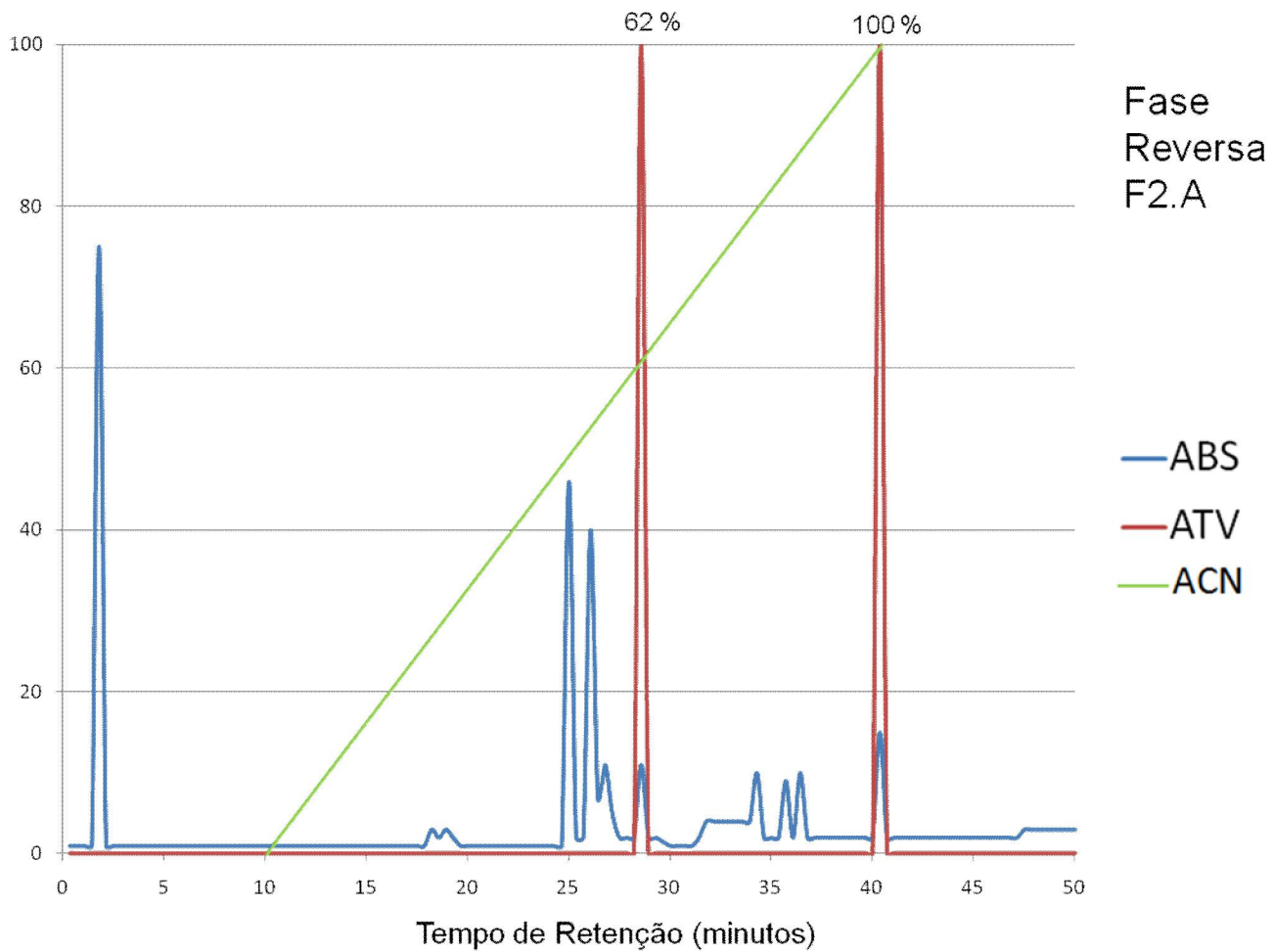
**Figura 22 – Cromatografia de Filtração Molecular / Superose 12 - Pico 2** – Fluxo de 30 mL/h, eluição em tampão borato 50 mM 0,4 % CHAPS. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise) e em azul (ABS) absorvância (280 nm).



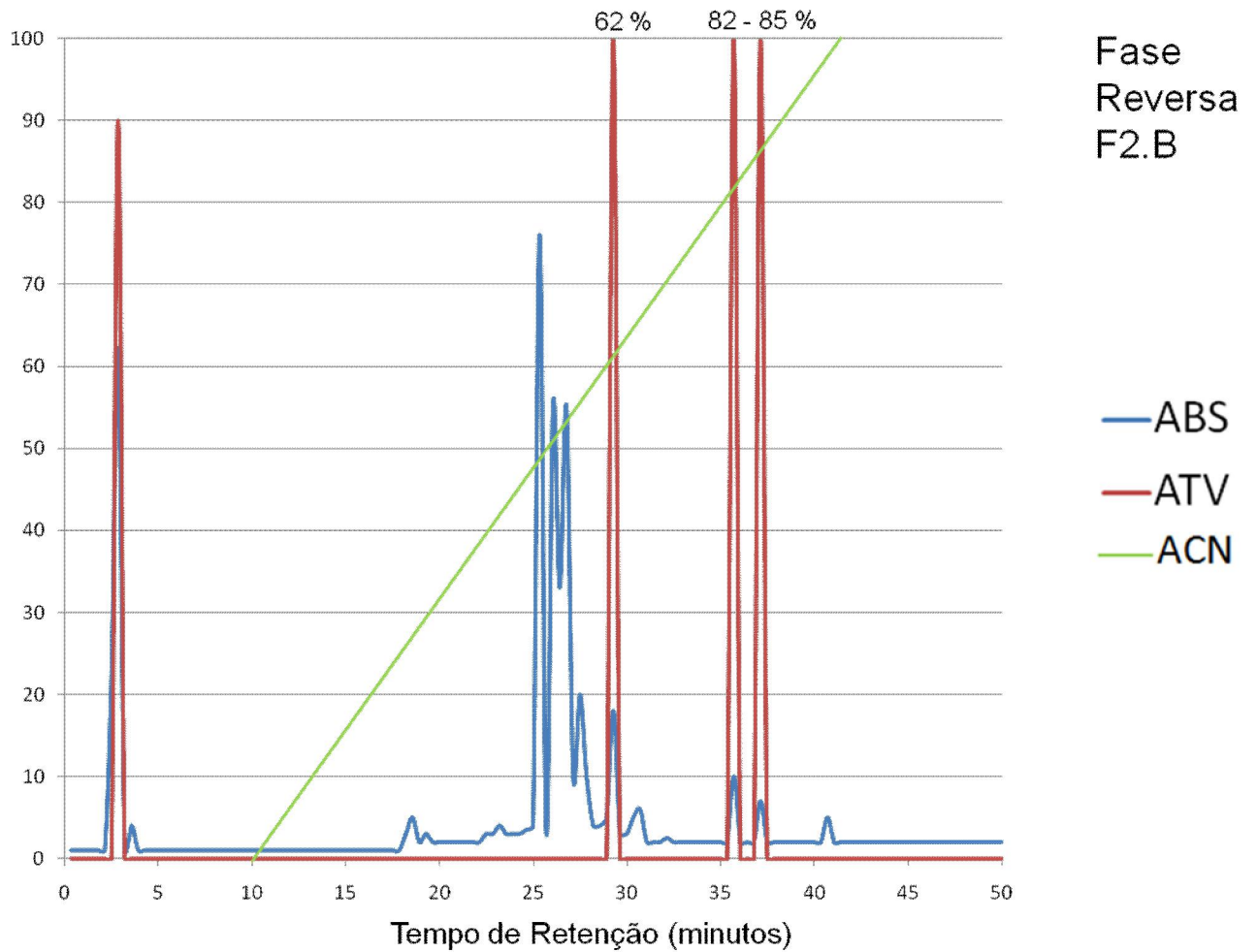
**Figura 23 – Cromatografia de Filtração Molecular / Superose 12 - Pico 3** – Fluxo de 30 mL/h, eluição em tampão borato 50 mM 0,4 % CHAPS. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise) e em azul (ABS) absorbância (280 nm).



**Figura 24 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F1 –** Gradiente de 0-100 % ACN em 0,1% TFA por 30 minutos. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise), em azul (ABS) absorvância a 280 nm e em verde (ACN) gradiente de acetonitrila, os valores nos picos indicam a porcentagem de ACN no ponto.

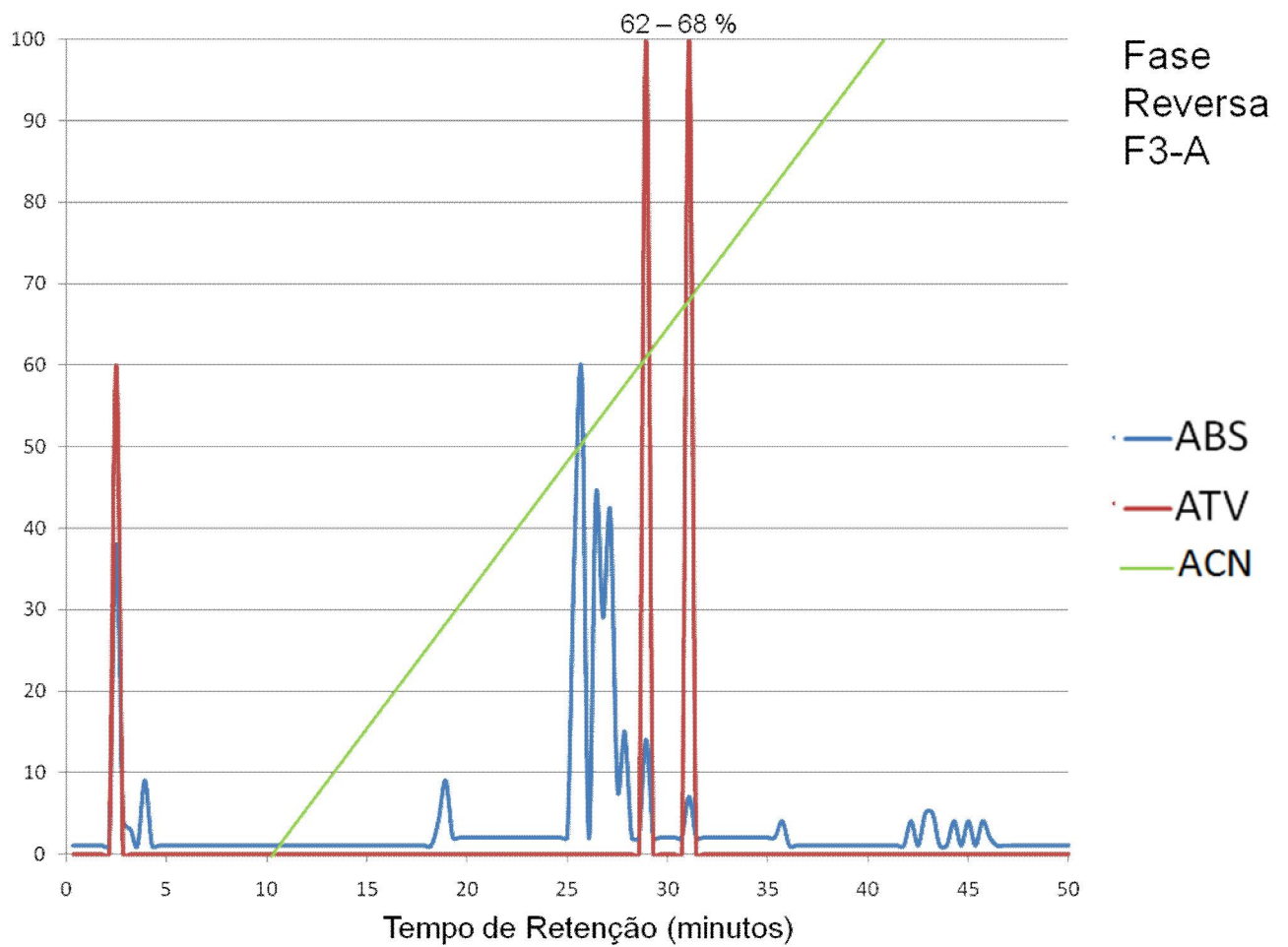


**Figura 25 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 2.A** – Gradiente de 0-100 % ACN em 0,1% TFA por 30 minutos. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise), em azul (ABS) absorvância a 280 nm e em verde (ACN) gradiente de acetonitrila, os valores nos picos indicam a porcentagem de ACN no ponto.

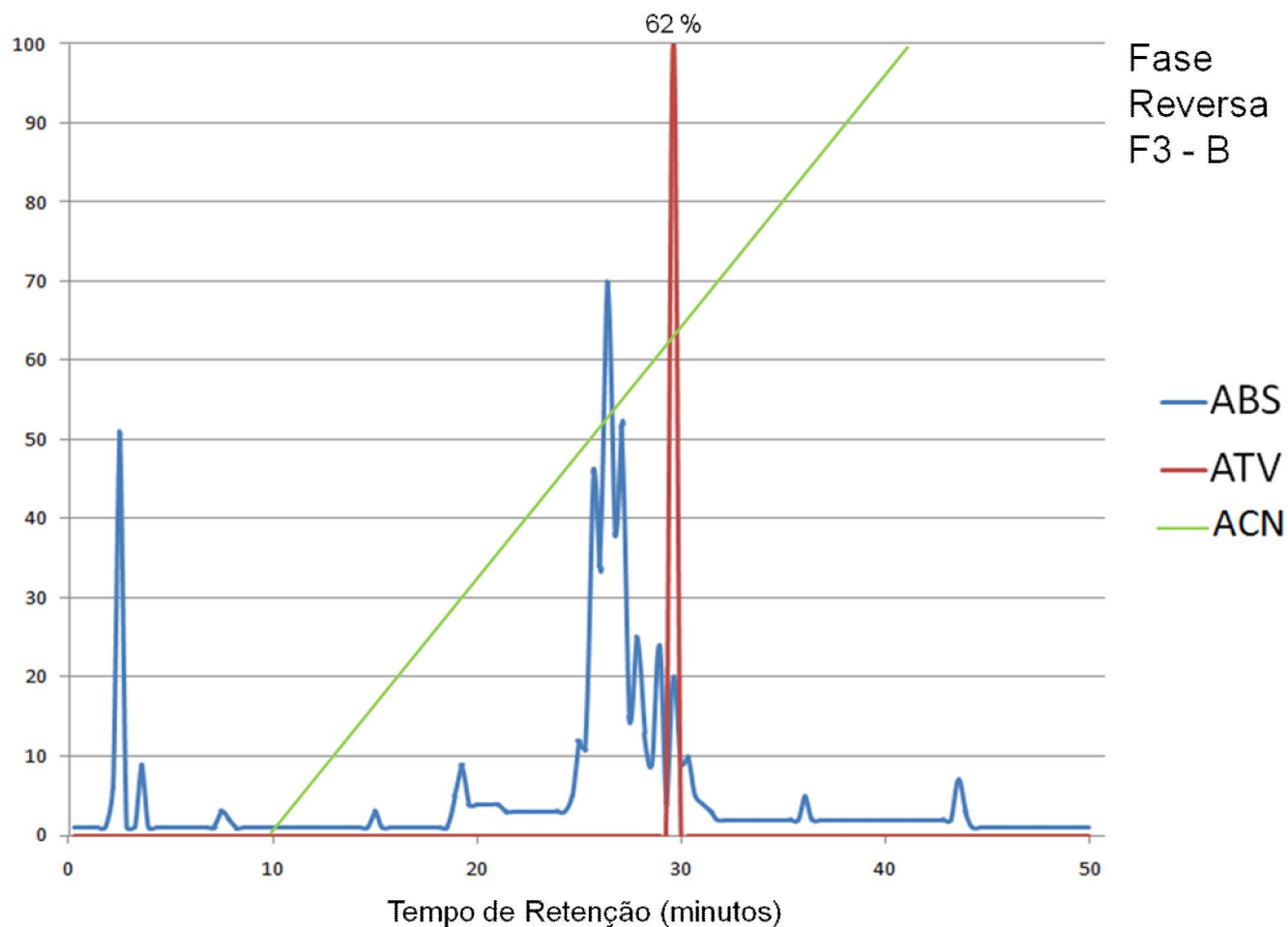


**Figura 26 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 2.B –** Gradiente de 0-100 % ACN em 0,1% TFA por 30 minutos. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise), em azul (ABS) absorvância a 280 nm e em verde (ACN) gradiente de acetoneitrila, os valores nos picos indicam a porcentagem de ACN no ponto.





**Figura 27 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 3.A** – Gradiente de 0-100 % ACN em 0,1% TFA por 30 minutos. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise), em azul (ABS) absorbância a 280 nm e em verde (ACN) gradiente de acetonitrila, os valores nos picos indicam a porcentagem de ACN no ponto.

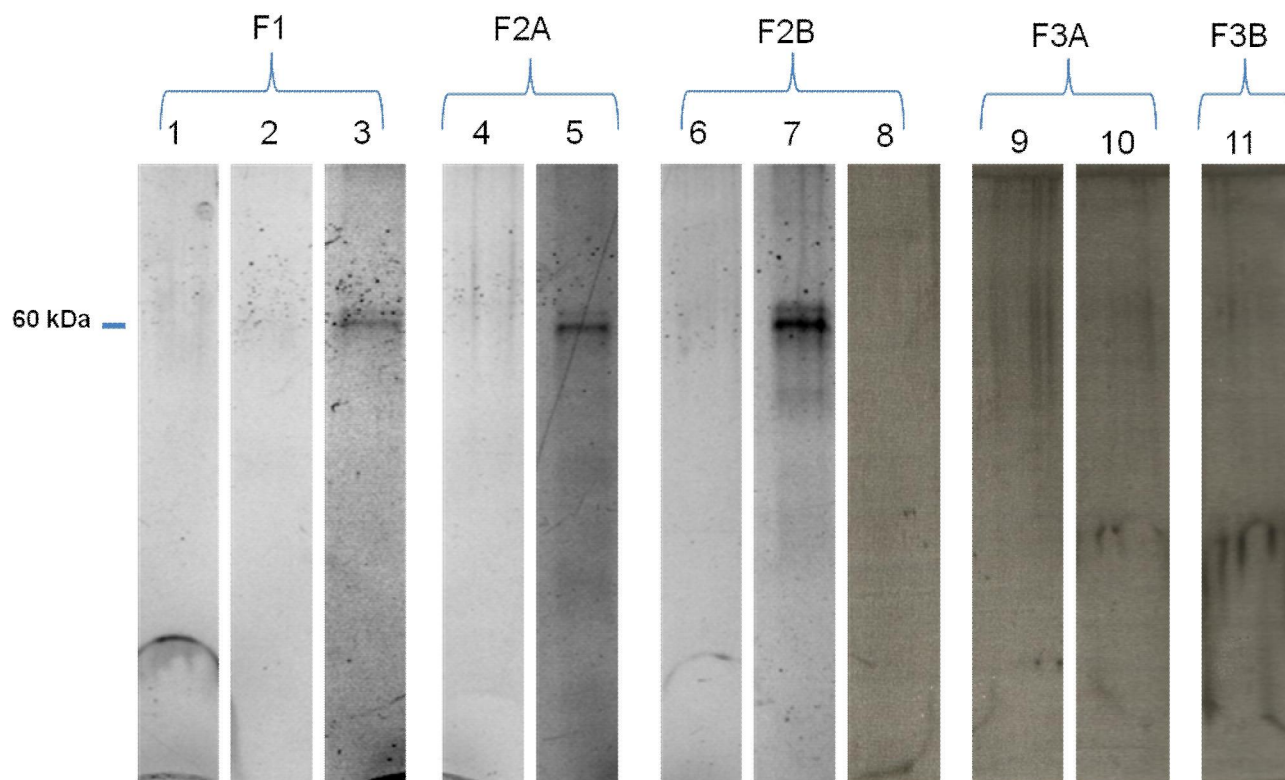


**Figura 28 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C18 – F 3.B –** Gradiente de 0-100 % ACN em 0,1% TFA por 30 minutos. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise), em azul (ABS) absorbância a 280 nm e em verde (ACN) gradiente de acetonitrila, o valor no pico indica a porcentagem de ACN no ponto.

teriam eluído no *void* da coluna por saturação da capacidade da mesma e corresponde realmente às moléculas que não se ligaram à coluna (resultados não mostrados). Cada uma das três frações era então submetida à filtração molecular, sendo que as frações correspondentes ao primeiro pico de atividade deu origem a uma única fração ativa (F1) (Fig. 21) e cada uma das outras duas deram origem a 2 frações ativas (F2A e F2B, Fig. 22) (F3A e F3B, Fig. 23). Estas foram então submetidas individualmente à cromatografia de fase-reversa após o que obtivemos o seguinte perfil: a F1 deu origem a 3 frações ativas (F1.1, F1.2 e F1.3, Fig. 24), a F2A a 2 frações ativas (F2A.4 e F2A.5, Fig. 25), a F2B a 3 frações ativas (F2B.6, F2B.7 e F2B.8, Fig. 26), a F3A a 2 frações ativas (F3A.9 e F3A.10, Fig. 27) e a F3B a apenas 1 fração ativa (F3B.11, Fig. 28), totalizando 11 frações hemolíticas.

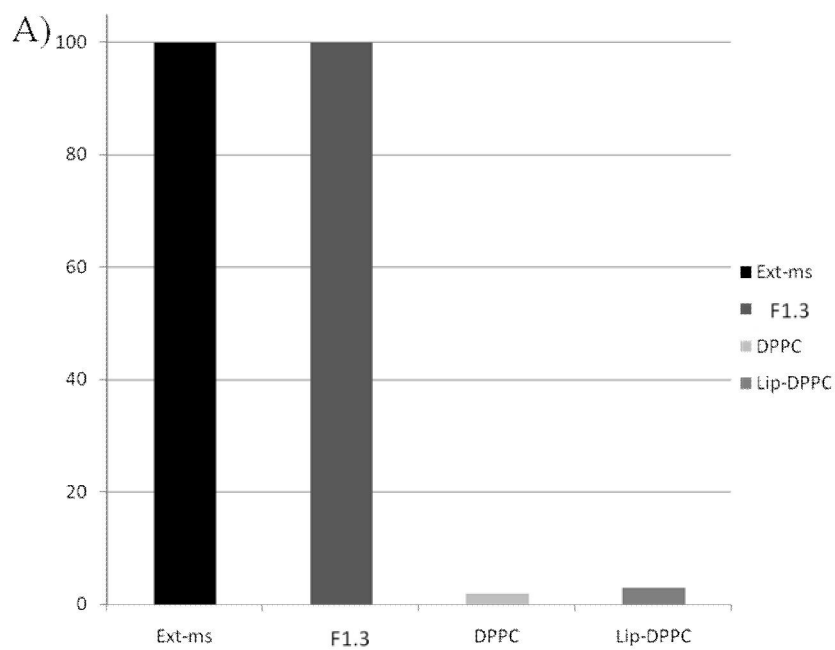
Na figura 29 está o perfil eletroforético das 11 frações. Um dublete de proteínas foi visualizado na região de 60 kDa apenas nas frações F1.3, F2A.5 e F2B.7, embora as outras 8 frações também fossem hemolíticas. Nas restantes, não visualizamos nenhuma molécula protéica. As atividades líticas detectadas em algumas frações (Figs. 24, 26 e 27) antes do início do gradiente de acetonitrila, provavelmente é resultado da concentração do detergente CHAPS vindo da cromatografia anterior, uma vez que, nenhum dos três tratamentos que inativam o Ext-ms inicial, a saber a desnaturação pelo calor, a remoção por lipossomos e a inibição por DPPC não foram capazes de diminuir sua atividade lítica (resultados não mostrados). Assim, essas frações foram desconsideradas.

Para verificarmos se a fração final ativa eluída na cromatografia de fase reversa ainda possuía as propriedades apresentadas pelo Ext-ms original escolhemos uma das frações ativas que apresentaram conteúdo protéico na etapa final (Fig 29, F1.3) e analisamos duas características apresentadas pela citolisina em Ext-ms recém preparados: a inibição da atividade pela incubação com DPPC e a ligação das citolisinas a lipossomos unilamelares de mesma composição lipídica. Como esperado, a atividade foi completamente inibida no primeiro experimento e a atividade completamente removida após incubação com lipossomos (Fig. 30A). O perfil eletroforético desses lipossomos revelou que a proteína de 60 kDa é co-removida com a atividade lítica, a qual não é mais encontrada no sobrenadante hemoliticamente inativo (Fig. 30B).

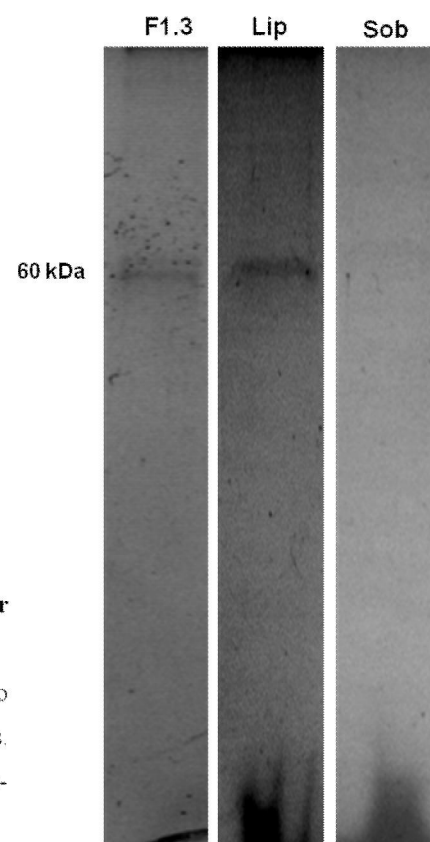


**Figura 29 – SDS – PAGE – Eletroforeses das frações líticas ao final do processo de purificação.**

Os diferentes picos vindos da cromatografia de troca iônica (Picos 1, 2.A, 2.B, 3.A e 3.B) foram submetidos à cromatografia de fase reversa e subdividiram-se em 11 picos hemoliticamente ativos. Nesta última etapa, acima encontra-se o perfil eletroforético (SDS-PAGE) de cada um desses 11 picos corados pelo coomassie coloidal. À esquerda da primeira canaleta encontra-se assinalado o peso molecular de 60 kDa.



B) Eletroforeses



**Figura 30 – Inibição da hemólise por DPPC e remoção da atividade hemolítica por lipossomos de DPPC da fração F1.3 proveniente da cromatografia de fase reversa**

**A** – A fração F1.3 (Fig. 30) foi incubada com DPPC e lipossomos de mesma composição para verificar a inibição da atividade lítica e a co-remoção de proteínas pelos lipossomos.

**B** – Visualização de proteínas F1.3 que foram co-removidas com a atividade lítica (Lip-DPPC) e perfil eletroforético do sobrenadante hemoliticamente inativo (Sob).

### **3.5.2.2- Identificação da proteína de 60 kDa purificada por cromatografia na região e co-removida por lipossomos.**

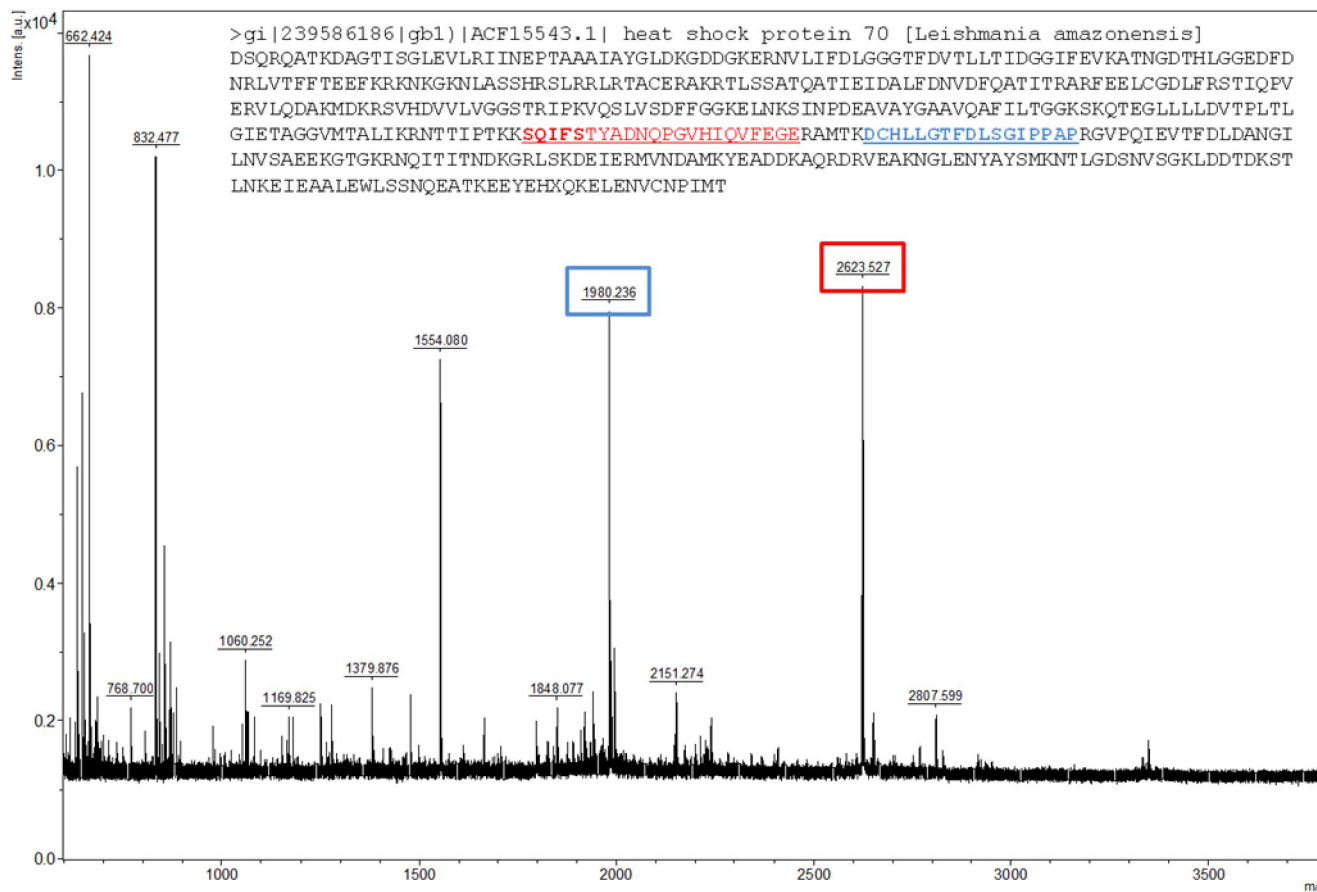
Os peptídeos trípticos da proteína de 60 kDa (Fig. 29, F1.3) foi foram analisados por espectrometria de massa. De seu espectro de fragmentação escolhemos dois peptídeos de bom sinal de ionização e, pelo módulo de fragmentação, os sequenciamos. O espectro e a sequencia de aminoácidos obtidas encontram-se representados na figura 31 e verificamos que ambos são provenientes da proteína HSP70 (Heat-Shock Protein 70) de *L. amazonensis*.

### **3.5.2.3- Análise das frações líticas obtidas ao final da cromatografia de fase reversa.**

Como havíamos realizado a eletroforese com 10 ou 12,5 % de acrilamida poderíamos não estar visualizando moléculas menores que 10 kDa. Assim, analisamos cada uma das frações mostradas na figura 30 por espectrometria de massas para verificar a presença ou ausência de outras moléculas menores que também pudessem apresentar atividade lítica. Assim, de fato, em uma das frações obtidas (F2A.5) também verificamos a presença de um abundante peptídeo de 6.3 kDa (Fig. 32), que ainda não foi identificado. Nas demais frações, não foi possível observar outras moléculas menores.

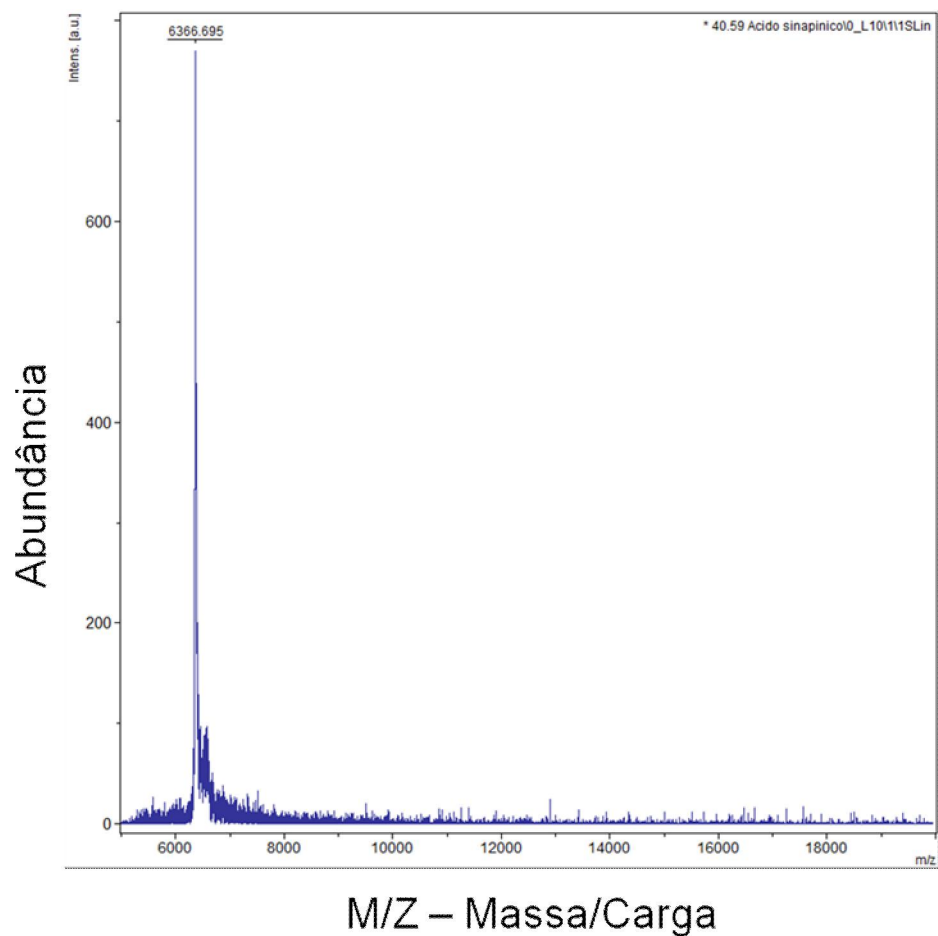
### **3.5.2.4- Cromatografias utilizando Ext-ms tratado com proteinase K.**

Como já mencionado, a leishporina pode ser ativada por enzimas proteolíticas tanto do parasita como algumas proteases exógenas (Almeida-Campos & Horta, 2000, Fig. 11). Nessas condições, a atividade citolítica presente nos extratos do parasita aumenta à medida que a quantidade de proteínas no extrato diminui (Almeida-Campos, 2001). Na caracterização inicial da leishporina (Noronha et al., 1996) e nos experimentos mostrando a ativação proteolítica (Almeida-Campos, 2000), era evidente que a atividade da leishporina é bastante resistente à digestão proteolítica. Todavia, em experimentos anteriores o tratamento com tripsina reduzia substancialmente a atividade,



**Figura 31 – Identificação da proteína de 60 kDa presente na fração F1 .3 (Fig. 30)por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).**

A proteína foi retirada do gel, descorada e tripsinizada. Seus peptídeos triptícos foram eluídos, concentrados, dessalinizados e analisados ao espectrômetro de massas. Dois peptídeos foram sequenciados (assinados em azul e vermelho) e com estas seqüências verificamos nos bancos de dados disponíveis que se tratava da proteína HSP70 de *Leishmania amazonensis*.



**Figura 32 – Análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da fração F2-A-5 proveniente da cromatografia de fase reversa do experimento anterior (Fig. 30).**

A amostra foi concentrada e analisada ao espectrômetro de massas (MALDI-TOF) para verificar a presença ou ausência de moléculas de baixo peso molecular. O pico refere-se a um peptídeo de ~ 6,3 kDa encontrado nesta fração lítica.

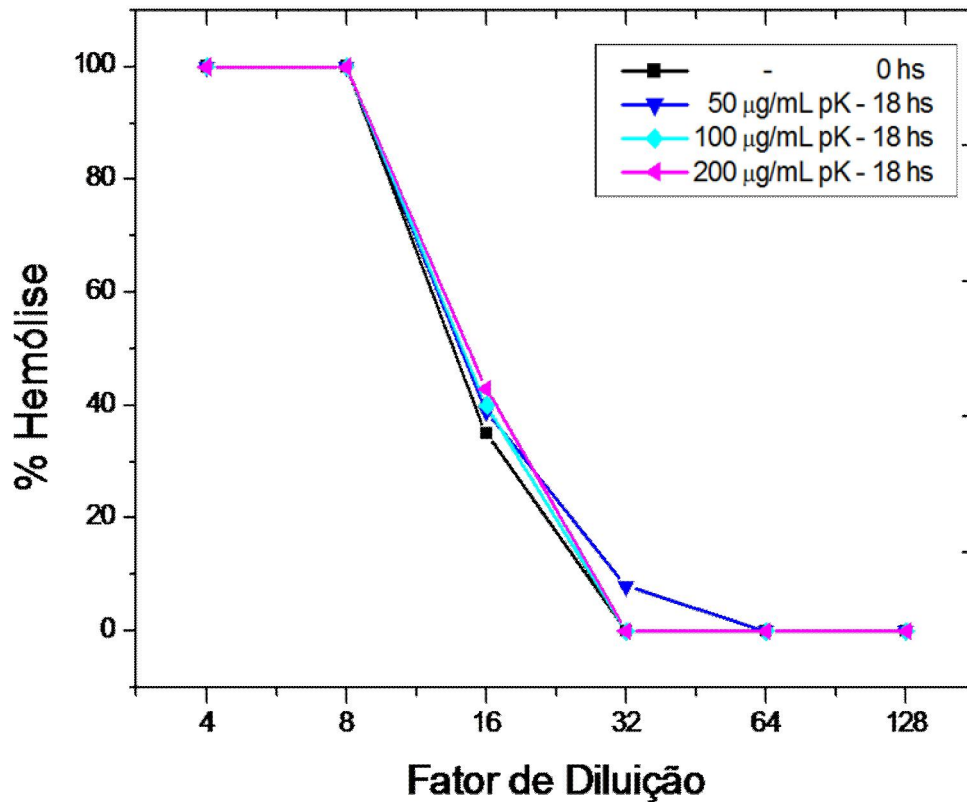


mostrando a importância de algum componente protéico. Assim, pensando que peptídeos ou outras moléculas geradas pela digestão ainda continuem com atividade hemolítica, decidimos fazer uma cromatografia de fase reversa utilizando a coluna C18 do produto de digestão com proteinase K do Ext-ms.

Antes, no entanto, avaliamos algumas das características do produto de digestão. Avaliamos, inicialmente, se a atividade hemolítica ou lipolítica de Ext-ms resiste a quantidades crescentes e elevadas de proteinase K. Nas figuras 33 e 34 podemos verificar que a presença de até 100 ou 200  $\mu\text{g/mL}$  de proteinase K não afeta a atividade hemolítica ou lipolítica, respectivamente, de Ext-ms. Proteinase K apenas foi incubada com hemácias nas mesmas concentrações utilizadas no experimento e não houve hemólise (resultado não mostrado). Esses resultados confirmaram que a atividade da leishporina é bastante resistente à proteólise. Os Ext-ms tratados com a protease foram analisados por SDS-PAGE para verificar a ação proteolítica da proteinase K. Como pode ser verificado na figura 36, a única proteína visível maior que 20 kDa após digestão é a própria proteinase K (29 kDa), indicando que a atividade hemolítica, após o tratamento com a proteinase K, está presente na fração que contém apenas moléculas com PM menor que 20 kDa.

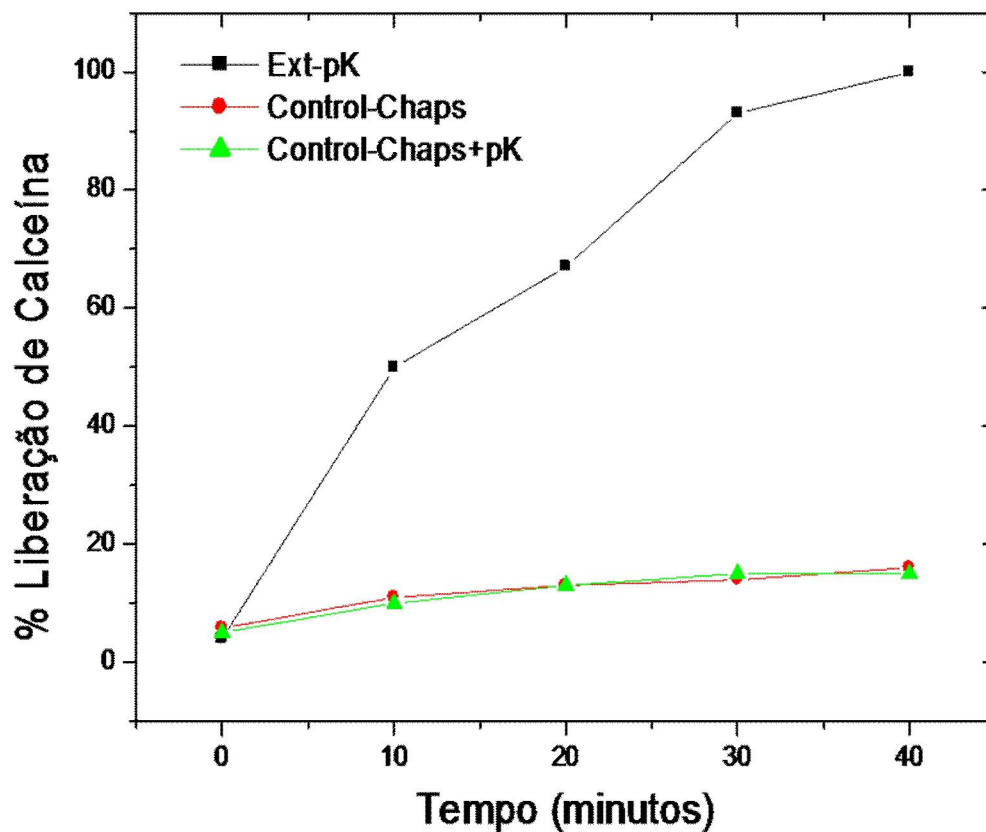
Avaliamos ainda a sensibilidade ao calor do produto de digestão e a remoção da atividade com lipossomos de extratos tratados ou não com 500  $\mu\text{g/mL}$  de Proteinase-K. Como pode ser visto na figura 35 Ext-ms ativos tem sua atividade totalmente abolida pelo aquecimento a 100 °C, como já demonstrado em vários resultados anteriores de nosso grupo e mesmo no presente trabalho. No entanto, após o tratamento com a protease esse tratamento desnaturante para proteínas não afeta a atividade hemolítica. Contudo, a atividade hemolítica é inteiramente removida por lipossomos de DPPC, que são inclusive lisados por Ext-ms após o tratamento com proteinase K, como mostrado anteriormente (Fig. 34). Deste modo, os extratos tratados com a protease não são mais termolábeis como os Ext-ms recém preparados (Fig. 35).

Os Ext-ms tratados com proteinase K foram então submetidos à cromatografia de fase reversa. Verificamos que a atividade hemolítica co-localizou com 6 frações eluídas da coluna C18 (Fig. 37). Contudo esses picos não apresentaram leitura a 280 nm (indicativo de moléculas protéicas) e, sim, a 214 nm. A análise dessas frações por espectrometria de massas mostrou que realmente as 6 frações só continham moléculas de baixo peso molecular, que variavam de com relação à sua M/Z de cerca de 917 a cerca de 1572 (Tabela 3), confirmando a análise por SDS-PAGE (Fig. 37, inserto). O



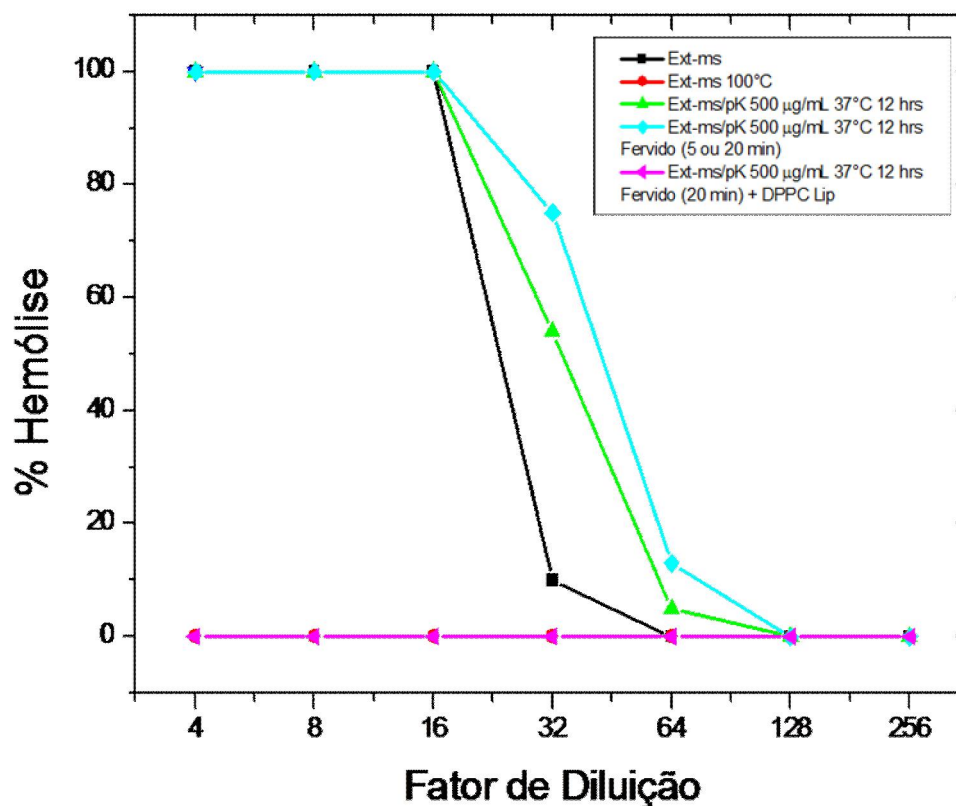
**Figura 33 – Efeito da Proteinase K sobre a atividade lítica de Ext-ms – hemácias.**

Ext-ms foi incubado ou não com quantidades crescentes de Proteinase K a 37° C durante 18 horas, após esse tempo o extrato foi novamente ensaiado para determinação de sua atividade hemolítica. Proteinase-K foi incubada com hemácias nas mesmas concentrações utilizadas e nenhuma lise foi observada (não mostrado).



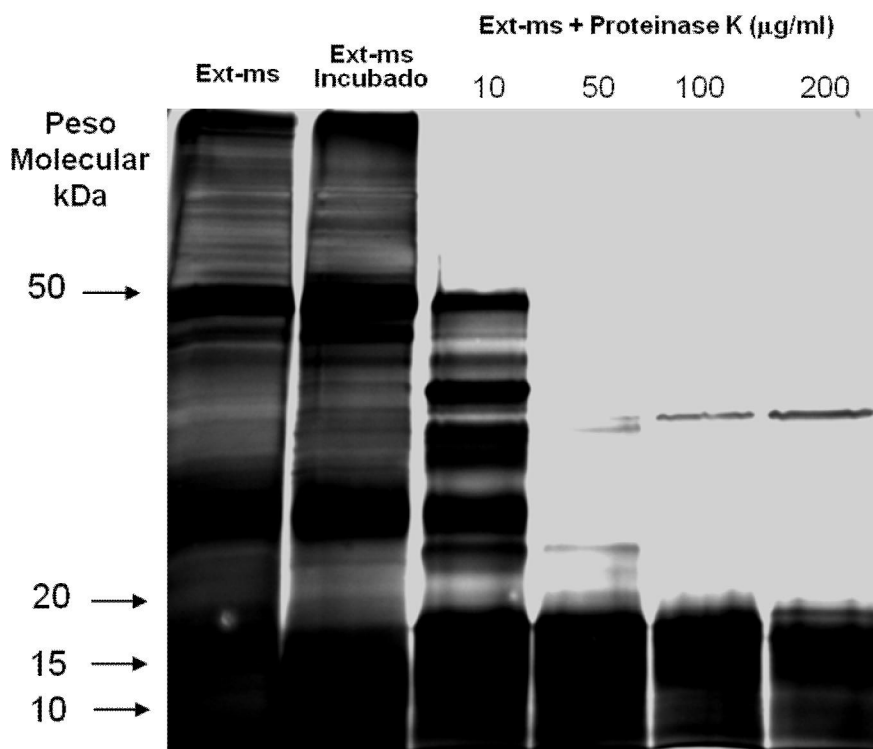
**Figura 34 – Efeito da proteinase-K sobre a atividade lítica de Ext-ms – lipossomos.**

Ext-ms foi incubado com 100 µg/mL proteinase-K durante 18 hs e então com lipossomos de DPPC contendo calceína. Lipossomos incubados com CHAPS ou CHAPS + proteinase-K não foram lisados. A liberação de calceína foi medida em fluorímetro nos intervalos de tempo indicados.



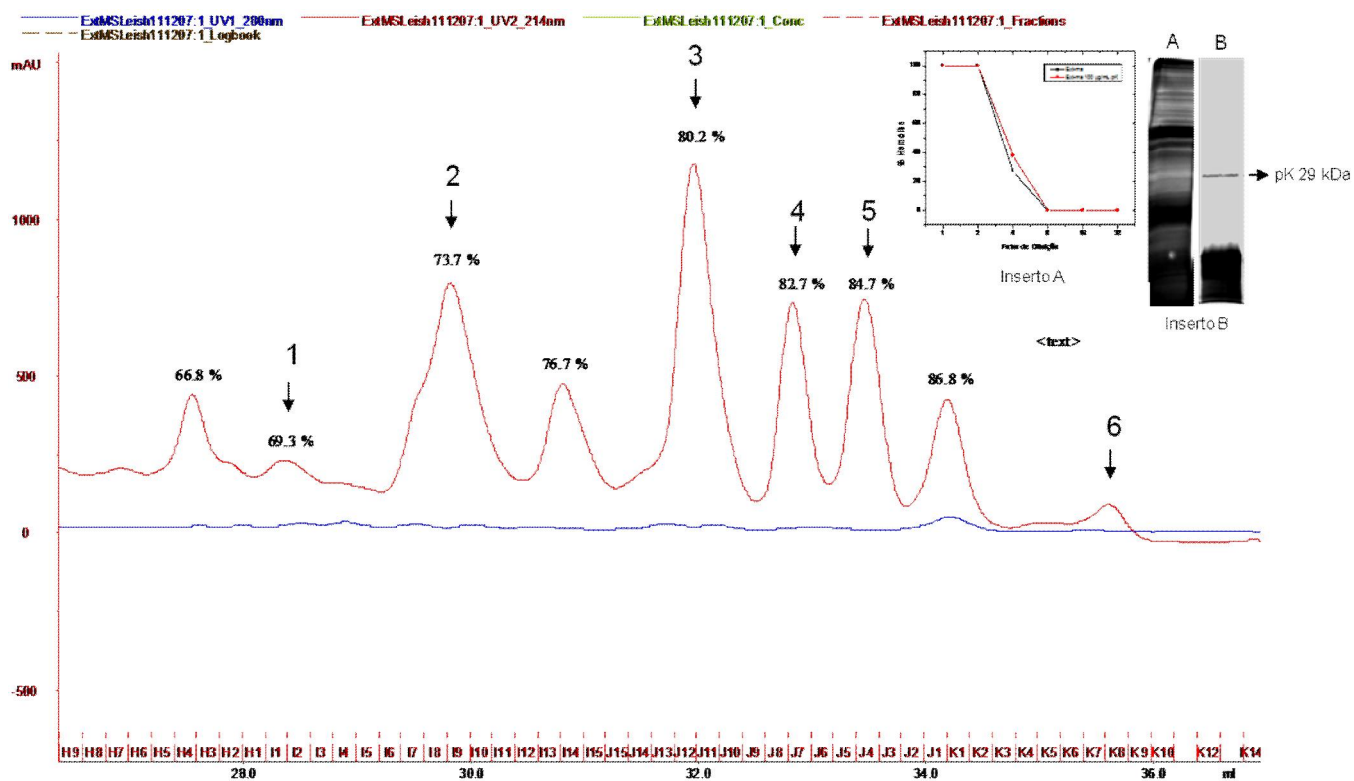
**Figura 35 – Sensibilidade de Ext-ms digerido por Proteinase K à desnaturação pelo calor e ao tratamento de incubação com lipossomos.**

Ext-ms hemoliticamente ativos foram tratado com Proteinase-K 500 µg/mL. Após verificação da digestão pela eletroforese (resultado não mostrado), foram ensaiados quanto à sua atividade hemolítica antes e após sua fervura e após incubação com lipossomos.



**Figura 36 – SDS-PAGE de Ext-ms digeridos por Proteinase K.**

Amostras de 100 µL (concentrados para 10 µL) de cada extrato, incubados ou não com Proteinase K, obtidos do experimentos da figura 33 e que continuavam hemolíticos foram fracionados por SDS-PAGE e o gel foi corado pelo método da prata.



**Figura 37** – Cromatografia de Fase-Reversa de Ext-ms tratado com 100 µg/mL de proteinase-K

Após tratamento com Proteinase-K, Ext-ms foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18. Todas as frações foram ensaiadas quanto à presença de atividade hemolítica. Os números de 1 a 6 indicam os picos de atividade hemolítica e as porcentagens indicadas são referentes ao percentual de acetonitrila necessário para eluição no ponto. Inseto – Atividade do extrato (A) e SDS-PAGE antes e após tratamento com a proteinase-K (B).

Fração	Faixa Massa/Carga	Molécula Mais Abundante
1	985.5936 – 1572.7814	1229.7581
2	1039.6691 – 1135.6467	1039.6691
3	1060.0295 – 1293.0496	1082.0277
4	1043.6769 – 1091.6705	1043.6769
5	1043.6619 – 1229.7571	1136.7173
6	917.2448 – 1560.7073	1072.0660

**Tabela 3 – Análise das massas das moléculas líticas em cada uma das seis frações hemolíticas obtidas após a cromatografia de fase reversa do extrato de *L. amazonensis* tratado com 100 µg/mL de proteinase-K por 12 horas. Os espectros utilizados para se construir esta tabela encontram-se no anexo de espectros de massas.**

maior peso molecular estimado não passa de 1,6 kDa, o equivalente a cerca de 13 aminoácidos, caso seu conteúdo molecular seja protéico. No entanto, a fragmentação observada de todas as frações hemolíticas não gerou quebras típicas de peptídeos, sugerindo que a atividade lítica nas frações cromatográficas do Ext-ms tratado com proteinase K não está associada a proteínas ou peptídeos.

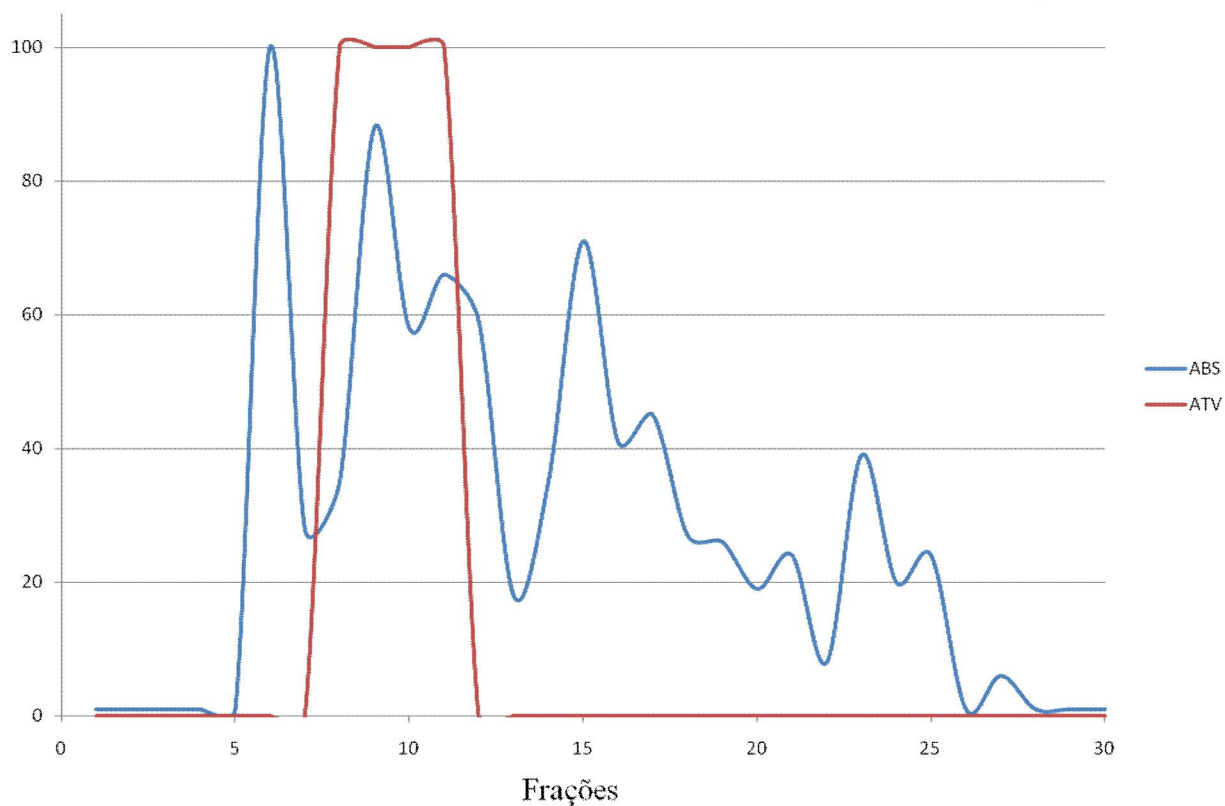
Em conjunto, esses resultados mostram o quão resistente à proteólise é a atividade lítica presente nos extratos do parasita, apontando ainda para a possível existência (ou co-existência) de um composto lítico de natureza não protéica.

### **3.5.2.5- Cromatografias utilizando Ext-ms tratado com g-HCl**

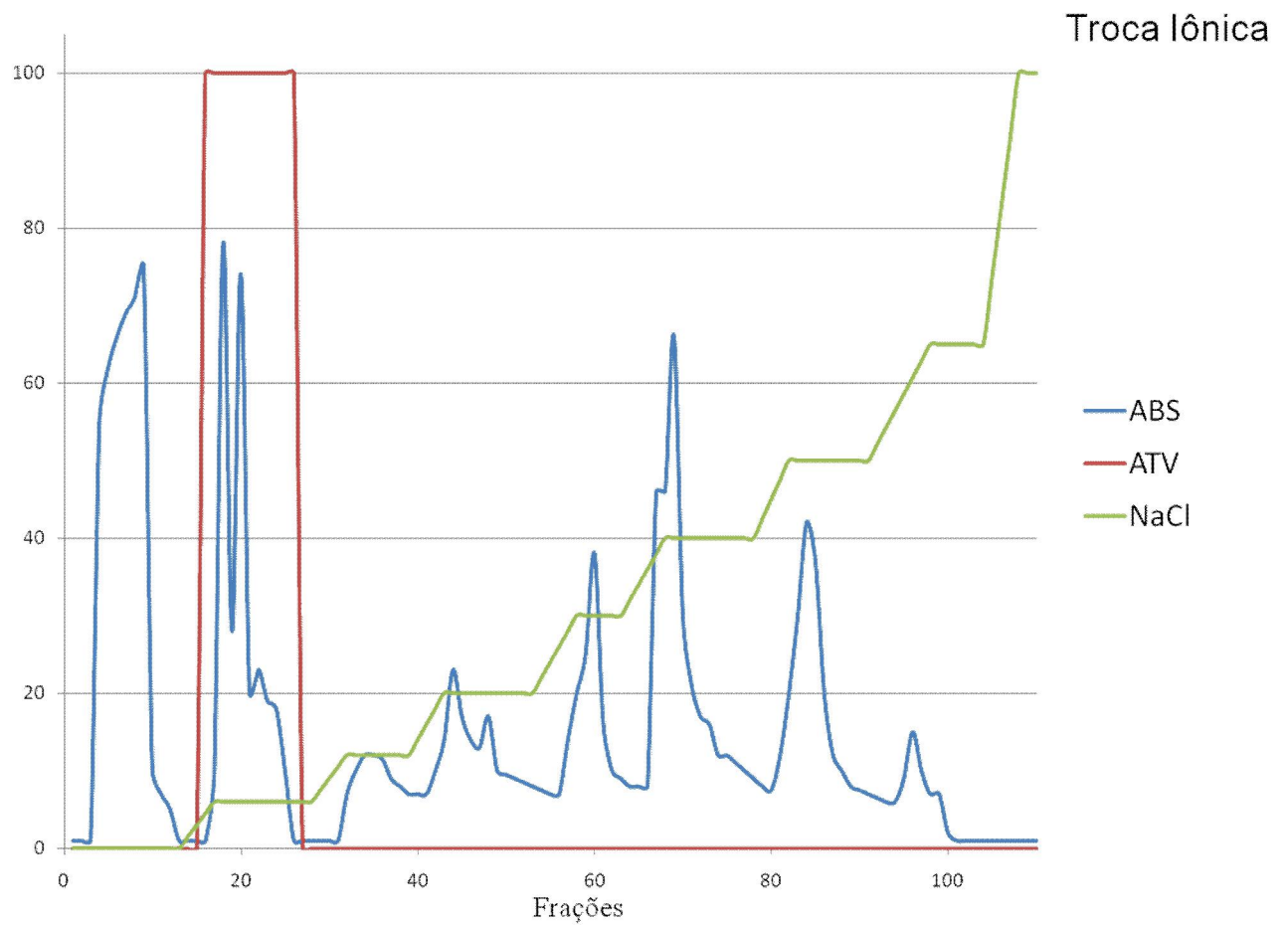
Um outro protocolo por nós utilizado para a purificação envolveu a ativação prévia da leishporina com g-HCl. Como mencionado anteriormente, o tratamento com g-HCl dissocia a molécula de um inibidor, ativando as citolisinas inativas presentes no extrato. Esse tratamento visou obter a leishporina apenas em sua forma ativa e, desta forma, otimizar a obtenção de moléculas ativas puras. Mantivemos o g-HCl presente apenas durante a primeira cromatografia, que, neste protocolo, foi a filtração molecular ao invés de troca iônica. A filtração molecular (Superose 12) resultou na separação de uma fração ativa (Fig. 38). A fração lítica proveniente da filtração molecular foi dialisada e submetida à cromatografia de troca iônica (Resource-Q). Durante o experimento monitoramos a atividade lítica que, além de ser aumentada pelo tratamento com g-HCl, manteve-se estável durante todo tempo no qual o extrato lítico ficou na presença do agente dissociante, ou seja até que o mesmo fosse removido por diálise para que o segundo passo, que era a cromatografia de troca iônica, pudesse ser realizado sem sua interferência. Após a troca iônica, reunimos dois picos protéicos com atividade hemolítica em uma única fração (Fig. 39). Esta fração foi então submetida à última etapa de purificação, a cromatografia de fase reversa (Coluna C18). Ao final, foram obtidas três frações hemolíticas (Fig. 40) F1, F2 e F3. Com o intuito de não perder moléculas de baixo peso molecular e outros compostos não visualizáveis à eletroforese estas frações foram diretamente analisadas ao espectrômetro de massas. Tratamos assim cada uma das três frações líticas com tripsina imobilizada (mais ativa, removível da suspensão por sedimentação e aconselhável para espectrometria de massas por não gerar picos de autólise). Acompanhamos a digestão a cada hora, ao longo de 8 horas, para



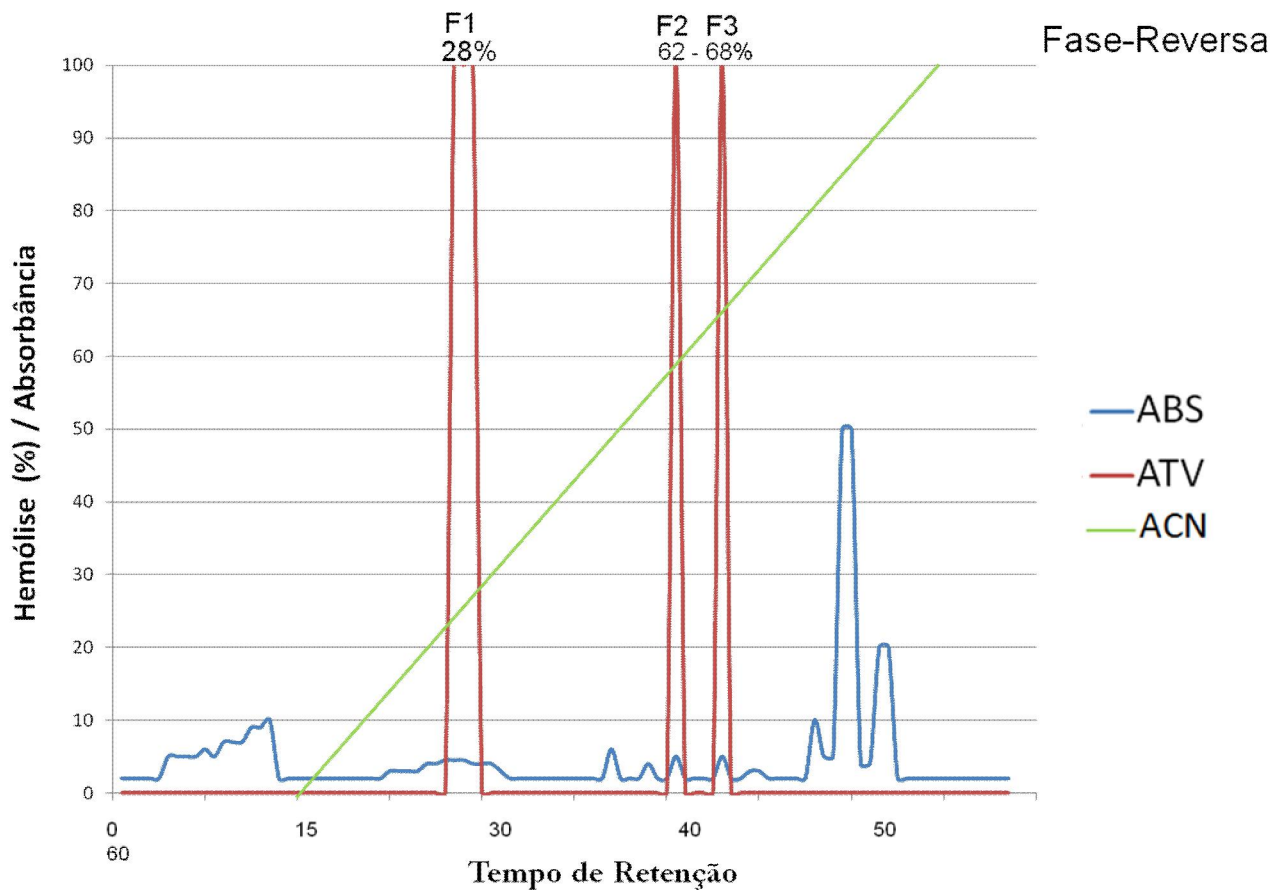
## Filtração Molecular



**Figura 38 – Cromatografia de Filtração Molecular na Presença de g-HCl/ Superose 12 Ext-ms –** Fluxo 30 mL/h, eluição em tampão borato 50 mM 0,4 % CHAPS e g-HCl 500 mM. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise) e em azul (ABS) absorvância (280 nm).



**Figura 39 – Cromatografia de Troca Iônica (Resource-Q) Fração ativa vinda da Filtração Molecular.** Fluxo de 30 mL/h com retenção do gradiente nos patamares indicados. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise), em azul (ABS) absorbância (280 nm) e em verde o gradiente de NaCl (de 0 a 1mM NaCl).



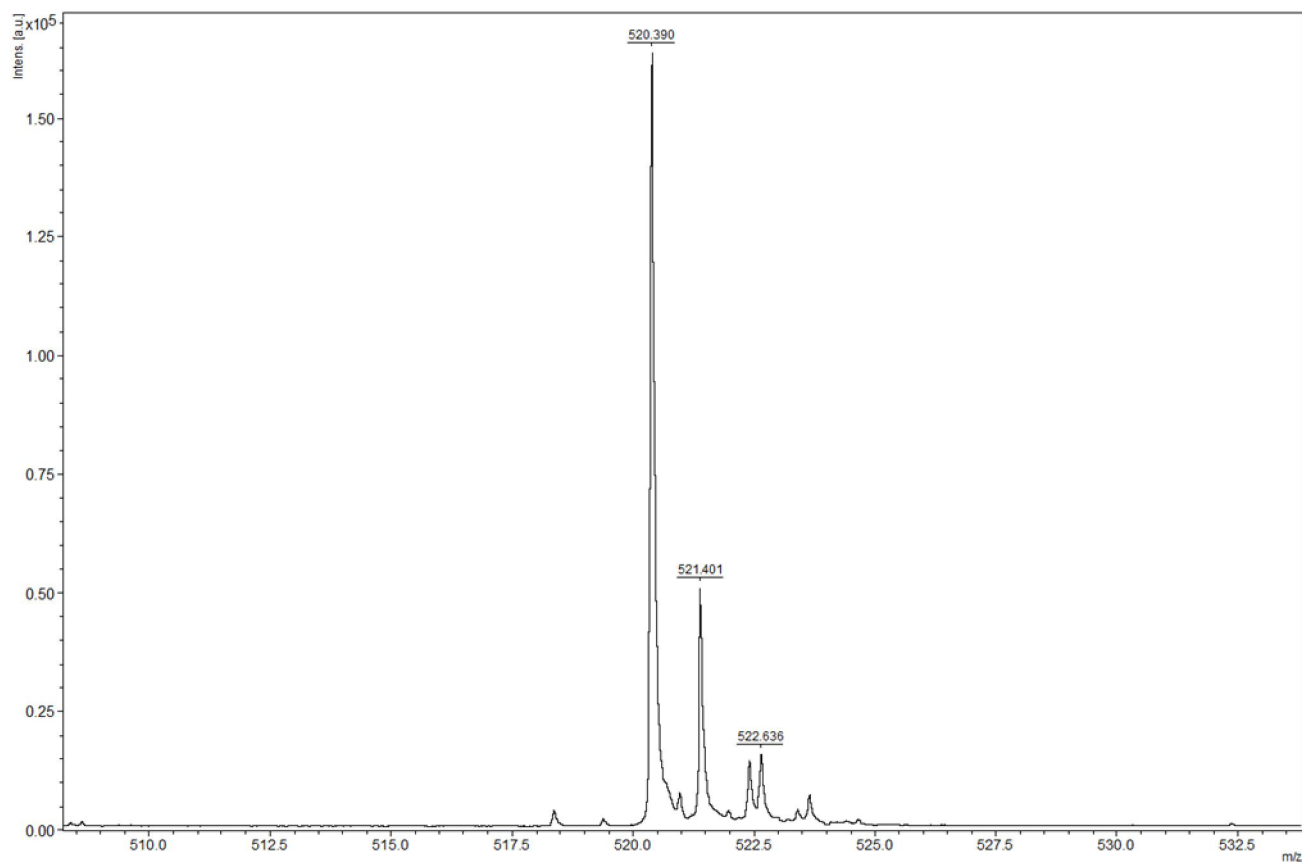
**Figura 40 – Cromatografia de Fase Reversa/Coluna C8 – Fração ativa vinda da Troca Iônica .**

Gradiente de 0-100 % ACN em 0,1% TFA por 30 minutos. Em vermelho (ATV) atividade hemolítica (% de lise) , em azul (ABS) absorbância a 280 nm e em verde (ACN) gradiente de acetoneitrila, os valores nos picos indicam a porcentagem de ACN no ponto.

identificarmos os possíveis peptídeos líticos liberados e sequenciá-los. No entanto, mesmo após incubação *overnight*, alquilação e redução das amostras, para favorecer a tripsinólise, nenhum fragmento peptídico pôde ser identificado, a não ser um auto-fragmento da própria tripsina, o que por si já era indicativo da ausência de substrato protéico. Entretanto o aparelho, desde o início, detectou um pico abundante de massa-carga (M/Z) 518 e outros dois de M/Z 520 nas amostras, como indicam as figuras 41 e 42. Apesar de termos efetuado os testes de controle da enzima, que encontrava-se extremamente ativa, decidimos ainda concentrar as amostras, separar alíquotas e incubá-las na presença da tripsina clássica (não imobilizada) e, mais uma vez, nenhum peptídeo, além de auto-fragmentos trípticos, foi gerado nas amostras hemolíticas.

A identificação das moléculas de M/Z 518 e M/Z 520 foi feita por clivagens moleculares e estudo das massas de seus fragmentos. Pudemos então identificar a presença de dois lisofosfolídeos de fosfatidilcolina, um deles apresentando a cadeia de ácido graxo como sendo de ácido linoléico (Fig. 43) e o segundo de ácido linolênico (Fig. 44). Essas identificações puderam ser feitas com precisão devido ao fato de termos trabalhado no modo de fragmentação, o que nos possibilitou identificar os íons resultantes e as massas/cargas das diferentes clivagens sofridas pelas moléculas como também indicado nas figuras 43 e 44. Desta forma, pudemos identificar fragmentos como o monoacilglicerol, com as cadeias de ácido graxo correspondentes identificadas, as fosfocolinas, as colinas, e algumas desidratações sofridas durante o processo. O lisofosfolídeo de ácido linoléico apareceu em duas das frações analisadas (F1 e F3) (Fig. 41), sendo que em uma delas apresentou-se em sua forma dimerizada (ver anexo de espectros), de forma que a sua clivagem resultou no mesmo padrão apresentado na figura 43. Já o lisofosfolídeo de ácido linolênico foi eluído na fração F2 (Fig. 42), e seu o padrão de fragmentação, utilizado para sua identificação molecular, está esquematizado na figura 44.

Para melhor caracterizar os lipídeos, essas três frações líticas contendo os dois lisofosfolídeos foram submetidas tanto ao tratamento desnaturante pelo calor (fervura a 100 °C, 10 minutos) quanto à incubação com lipossomos de DPPC. Como mostrado (Fig. 45), a atividade lítica dessas moléculas não é abolida pelo calor, à semelhança dos Ext-ms tratados com a proteinase-K (Fig. 35). Entretanto tratamento com os lipossomos remove a atividade hemolítica das três frações mostrando a interação dos lisofosfolídeos com o DPPC (Fig. 45).



**Figura 41 – Detecção por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica presente nas frações vindas da cromatografia de fase-reversa anterior ( Espectro representativo das frações F 1 e F3 anteriores).**

A fração lítica foi analisada ao espectrômetro de massas e revelou a presença de uma molécula de peso molecular (M /Z) de 520.

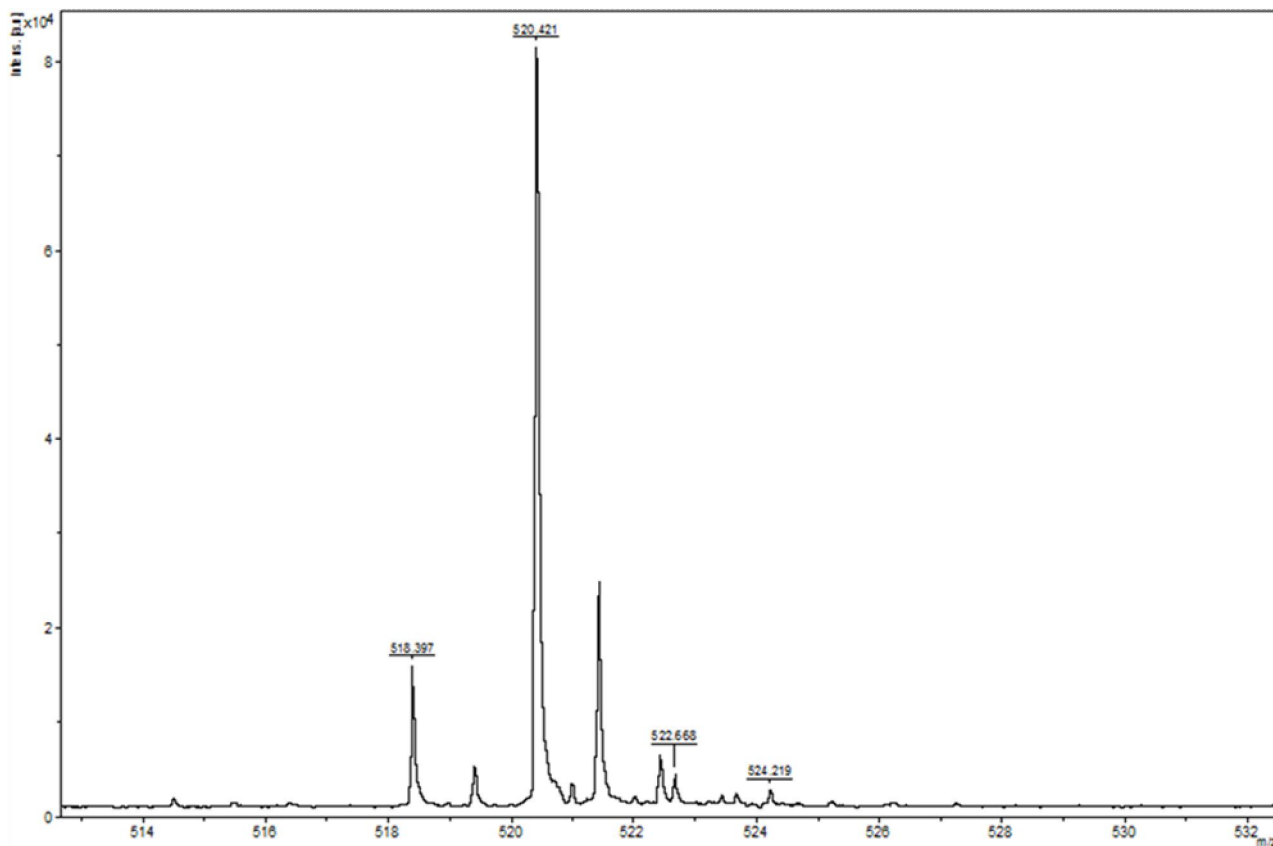
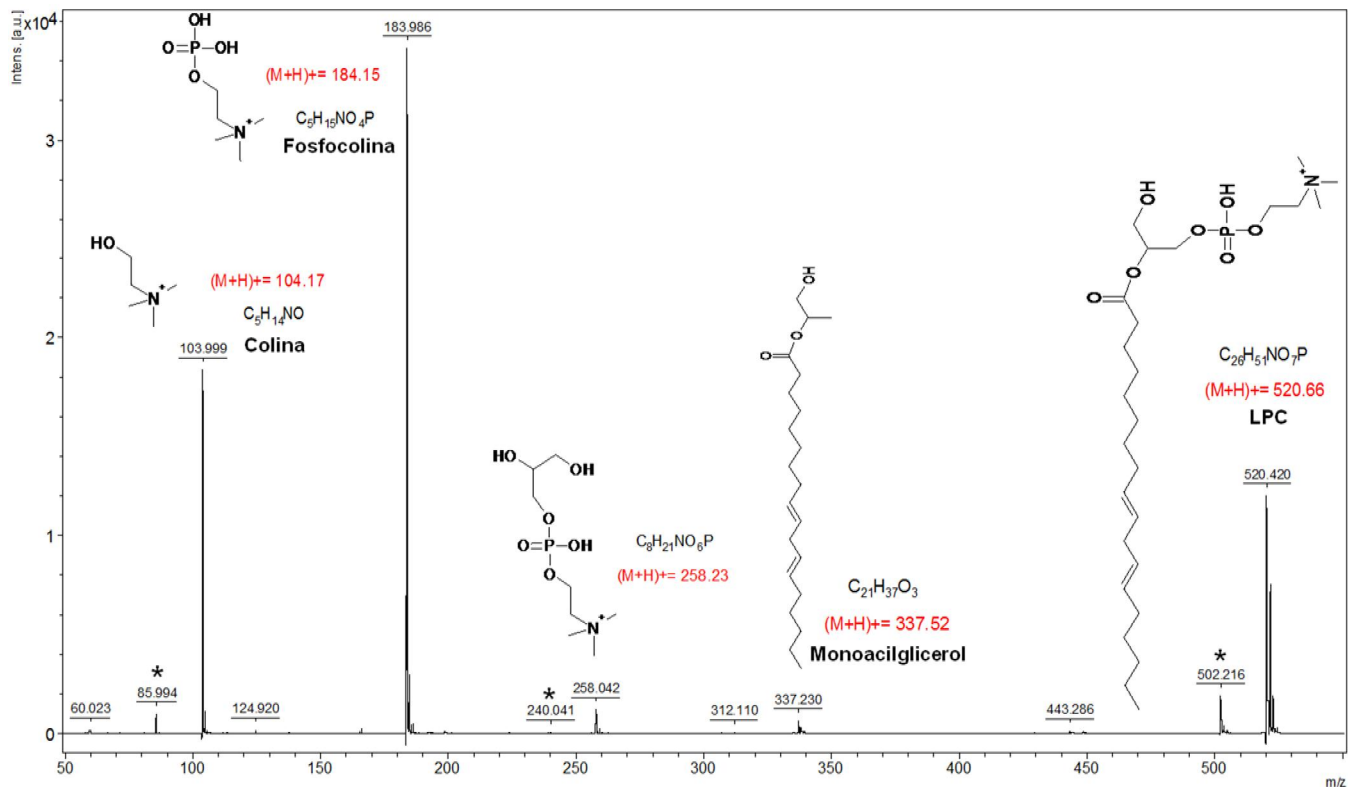
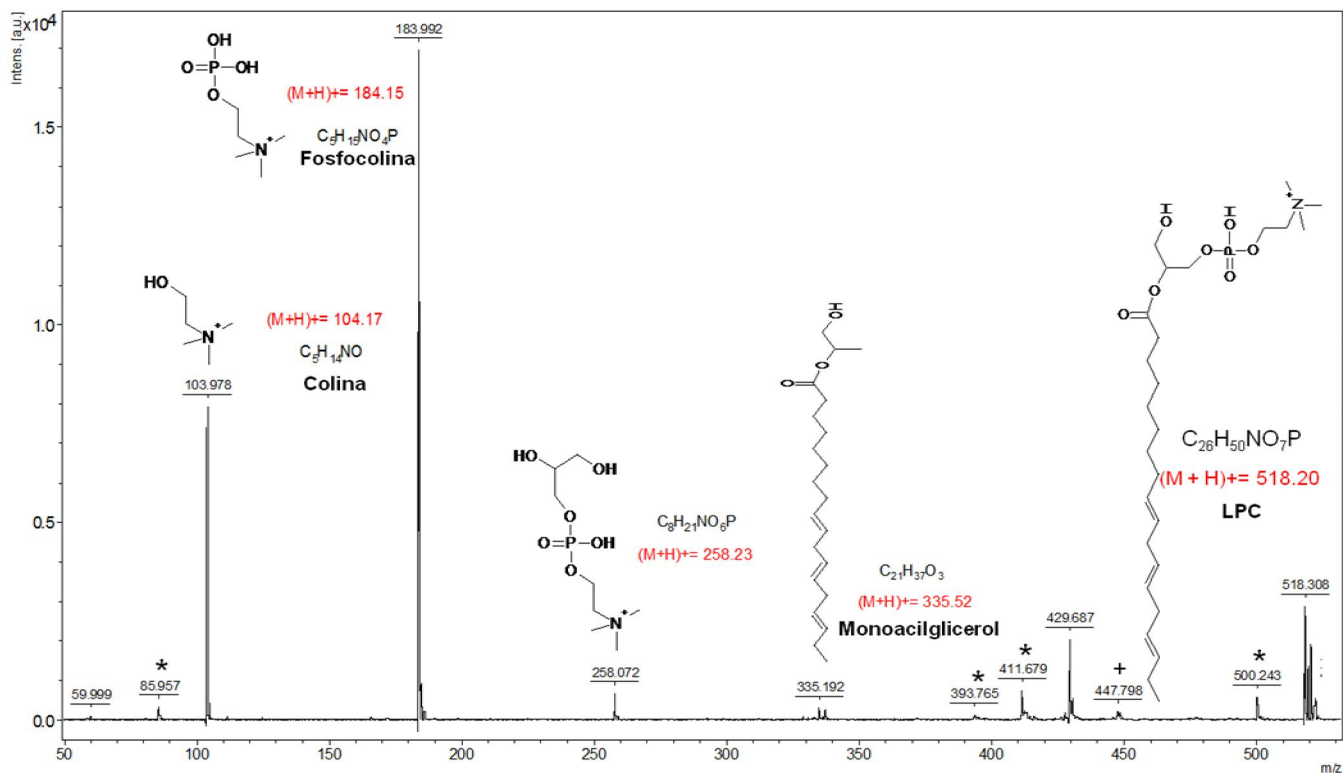


Figura 42 – Detecção por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica presente nas frações vindas da cromatografia de fase-reversa anterior (Espectro representativo da fração F 2 anteriores). A fração lítica foi analisada ao espectrômetro de massas e revelou a presença de uma molécula de peso molecular ( $M/Z$ ) de 520 e outra de ( $M/Z$ ) de 518.



**Figura 43 – Identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica de M/Z 520 obtida após a cromatografia de fase-reversa.**

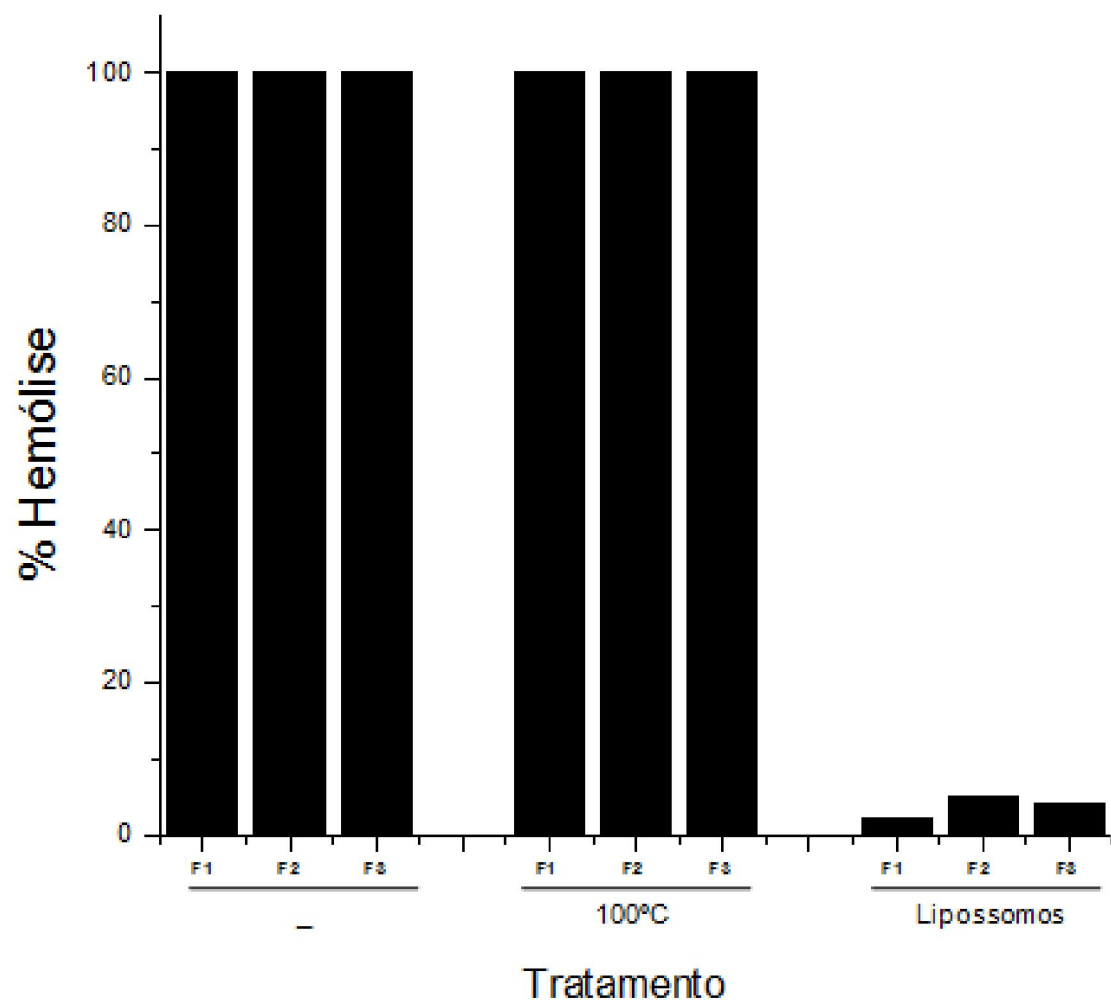
A fração lítica isenta de proteínas ou peptídeos foi analisada ao espectrômetro de massas e revelou a presença de uma molécula com peso molecular (M/Z) de 520, correspondente a um lisofosfolípido de fosfatidilcolina (LPC). As moléculas originadas da fragmentação comprovaram nossa identificação. Os asteriscos indicam desidratações ocorridas durante o processo. O ácido graxo observado apresentando duas insaturações faz correspondência ao ácido linoléico.



**Figura 44 – Identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) da molécula lítica de M/Z 518 obtida após a cromatografia de fase-reversa.**

A fração lítica isenta de proteínas ou peptídeos foi analisada ao espectrômetro de massas e revelou a presença de uma molécula com peso molecular (M/Z) de 518,308, correspondente a um lisofosfolípídeo de fosfatidilcolina (LPC). As moléculas originadas da fragmentação comprovaram nossa identificação. Os asteriscos indicam desidratações ocorridas durante o processo e o sinal de + uma hidratação observada. O ácido graxo observado apresentando três insaturações faz correspondência ao ácido linolênico.





**Figura 45 – Efeito da fervura ou da incubação com lipossomos de DPPC sobre as lisofosfatidilcolinas líticas purificadas.**

As três frações contendo as lisofosfatidilcolinas líticas purificadas e identificados nos experimentos anteriores foram fervidas por 10 minutos ou incubadas com 10  $\mu$ L de lipossomos de DPPC e sua atividade hemolítica analisada antes e após estes tratamentos

## 4-DISCUSSÃO

Citolisinas formadoras de poros já foram descritas em vários microrganismos patogênicos, incluindo protozoários, sendo que várias delas já foram implicadas na patogênese das doenças causadas pelos mesmos (Horta, 1997; Almeida-Campos et al., 2002; Parker & Feil, 2005; Ishino et al., 2005; Herbst et al., 2004).

A caracterização da leishporina como uma molécula formadora de poros de *L. amazonensis* nos leva a indagar sobre a função desta citolisina, tanto no ciclo de vida do parasita quanto na patogênese da leishmaniose. O fato de a leishporina ter atividade lítica ótima em pH 5,5 e a 37°C (Noronha et al., 1996; Noronha et al., 2000) sugere que ela possa agir dentro do fagolisossomo e fez o nosso grupo propor que, entre outras funções, ela estivesse envolvida com o rompimento do fagolisossomo, como já demonstrado para *Listeria monocytogenes* (Bielecki et al., 1990) e sugerido para *T. cruzi* (Andrews et al. 1990) e, posteriormente, do próprio macrófago infectado pelo parasita (Horta, 1997; Almeida-Campos et al., 2002), como já demonstrado para a *Legionella pneumophila* (Alli et al., 2000). Assim, é objetivo do nosso grupo investigar a(s) função(ões) da leishporina. Alcançar este objetivo depende de sua identificação e de sua caracterização molecular. O presente trabalho mostra a purificação de moléculas que acreditamos que possam ser a citolisina que inicialmente chamamos de leishporina e esclarece alguns aspectos sobre a interação desta citolisina de *L. amazonensis* com membranas e sobre a estrutura dos poros nelas formados.

Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que para lisar hemácias, a leishporina liga-se à membrana dessas células, etapa que é independente da temperatura (ocorre mesmo a 0 °C), sem causar lise. Esta advém apenas em temperaturas mais altas (ótima a 37 °C) e consiste, provavelmente, na inserção e/ou polimerização da leishporina na membrana da célula-alvo (Fig. 3 de Noronha et al., 2000). Neste trabalho, utilizando as condições que permitem somente a ligação da leishporina nas hemácias, confirmamos este resultado e mostramos ainda que a atividade hemolítica de Ext-ms é removida por essas células (Fig. 4A).

Para causar lise, PFPs precisam se ligar a receptores celulares. Várias PFPs reconhecem lipídeos, enquanto outras, proteínas ou carboidratos como receptores (Geney & Popoff, 2006 e Young & Collier, 2007). Neste sentido, uma parte do nosso trabalho consistiu em estudar qual seria o receptor ao qual a leishporina se liga às membranas-alvo e tentar utilizar esta característica de ligação para tentarmos purificá-la a partir de extratos líticos do parasita. Resultados anteriores do nosso grupo

demonstraram que nem carboidratos nem proteínas pareciam ser importantes mediadores ou moduladores da atividade da citolisina de *L. amazonensis* e que lipossomos multilamelares compostos de DPPC e colesterol apenas podiam remover a atividade hemolítica do Ext-ms, indicando a ligação da leishporina a esses lipídeos (Almeida-Campos, 2001; Castro-Gomes et al., 2009). Esses resultados sugeriram-nos que a leishporina utiliza lipídeos como receptores e que eles são suficientes para a ligação à membrana e para a atividade lítica. Assim, avaliamos outros dois grandes componentes de membranas naturais, os fosfolípidos e o colesterol. Utilizamos para isto lipossomos de DPPC ou DOPC acrescidos de colesterol, agora unilamelares, por mimetizam bem as membranas naturais em composição e estrutura. A suposição de que a leishporina se liga diretamente a lipídeos foi corroborada pelos seguintes resultados deste trabalho: 1) DPPC inibe completamente a atividade lítica do Ext-ms (Fig. 6); 2) lipossomos feitos de DPPC (Figs. 4B e 9) ou DOPC (não mostrado), à semelhança do que ocorre com as hemácias, removem prontamente a atividade lítica de Ext-ms de forma dose-dependente; 3) lipossomos de DPPC carregados com calceína são lisados por Ext-ms (Fig.8). A ausência da lise de lipossomos por Ext-ms aquecido a 100 °C ou quando o ensaio é feito a 0 °C confirma a termolabilidade da citolisina e a sua dependência da temperatura para a formação de poros, respectivamente, esta última demonstrada pelo fato de que lipossomos incubados com Ext-ms a 0 °C são imediatamente lisados quando têm sua temperatura elevada a 37 °C (resultado não mostrado). Este resultado corrobora resultados anteriores mostrando que em baixas temperaturas a leishporina é capaz de se ligar à membrana da hemácia sem causar hemólise (Fig. 3 de Noronha et al., 2000) e, uma vez ligadas, rapidamente podem se inserir e polimerizar com o aumento da temperatura, evidenciando mais uma vez essas duas etapas de ligação e de formação de poros. Essas etapas ocorrem também com outras citolisinas como a perfringolisina, produzida pela bactéria *Clostridium perfringens* (Heuck et al., 2000) e a pneumolisina, produzida pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* (Tilley et al., 2005). Esses autores demonstraram por microscopia eletrônica que o poro pré-formado desta citolisina se liga à membrana de lipossomos de modo independente da temperatura, sem lisá-los e que após um colapso vertical dependente da temperatura se inserem na bicamada lipídica provocando sua lise.

O fato de que vesículas feitas de um único lipídeo são lisadas pela leishporina indicaram que 1) ela se liga diretamente à porção lipídica da membrana, 2) que a ligação ocorre via fosfolípidos, 3) que essas são as únicas moléculas requeridas e 4) que elas são

suficientes para a ligação à membrana e a atividade lítica. PFPs de outros protozoários como as amebaporos (Andra et al., 2004) e as naegleriaporos (Young & Lowrey, 1989) também se inserem aos lípidos sem a mediação de receptores clássicos. Da mesma forma, algumas PFPs bacterianas se ligam diretamente a fosfatidilcolina, fosfatidil serina, fosfatidiletanolamina, colesterol ou esfingomiéline (Potrich et al., 2009; Valeva et al., 2006; Flanagan et al., 2009). Foi fundamental verificar que lipossomos de DPPC previamente incubados com Ext-ms e lavados extensivamente causam a lise de lipossomos da mesma composição que não tiveram contato prévio com o extrato do parasita (Fig. 10). Uma vez que lipossomos que não tiveram contato prévio com Ext-ms não lisam lipossomos de mesma composição, podemos inferir que é a leishporina ligada aos lipossomos pré-incubados com Ext-ms que lisa as vesículas livres de qualquer contato prévio com Ext-ms. Uma explicação plausível para este resultado é que a leishporina teria se transferido de um tipo de lipossomo para outro por fusão entre eles, fenômeno favorecido, no caso do DPPC, pela temperatura de 37 °C, temperatura de transição de fase deste lipídeo. Isto confirma que a leishporina lisa células utilizando apenas fosfolípidos, o único requisito na membrana das células-alvo para formar poros estáveis. Isto também fornece a demonstração final de que as moléculas que se ligam aos fosfolípidos contêm a atividade lítica e são suficientes para que ocorra a lise, eliminando a possibilidade de que lipossomos ou hemácias, quando removem a atividade hemolítica de Ext-ms, estariam meramente removendo do Ext-ms algum outro componente sem o qual a atividade lítica não ocorreria. Este achado está de acordo com resultados anteriores e deste trabalho que mostram, respectivamente, que embora hemácias (Fig. 3 de Noronha et al., 2000) ou lipossomos (não apresentados) incubados com Ext-ms não sejam lisados a 0 °C, eles o são, imediatamente, após rápida incubados a 37 °C.

Um fator importante para a ligação de citolisinas a membranas é o seu conteúdo lipídico, especialmente o de colesterol. Como já mencionado, citolisinas bacterianas podem ser agrupadas como dependentes de colesterol, sem o qual a citolisina não se liga à membrana e a lise não ocorre, e as independentes de colesterol (Tveten, 2005). Neste trabalho, demonstramos que a leishporina não usa o colesterol como sítio de ligação. Ao contrário do DPPC, o colesterol é incapaz de inibir a atividade hemolítica de Ext-ms, mesmo em altas concentrações (Fig. 6), sendo dispensável para a ligação da leishporina ao fosfolípido para a sua atividade citolítica, uma vez que ele não aumenta a capacidade de lipossomos de DPPC de remover a leishporina do Ext-ms (Fig. 5) ou a eficiência da

citolisina para lisar lipossomos de DPPC (Fig. 7). A independência do colesterol para sua ligação à membrana está de acordo com resultados anteriores que mostraram que a leishporina é capaz de se ligar a membranas bacterianas (Almeida-Campos, 2001; Castro-Gomes et al., 2009). Contudo, o colesterol pode ser um mediador negativo para a atividade mediada pela leishporina, uma vez que o aumento de sua concentração nos lipossomos previne, de forma dose-dependente, a lise de lipossomos (Fig. 7). Este resultado tomado junto com o fato de que as citolisinas se ligam à lipossomos que contêm 40% de colesterol (Fig. 5) é interessante pois mostra que, nessas condições, a citolisina é capaz de se ligar a essas vesículas mas não pode ocasionar a lise. Tomados em conjunto, estes dados mostram que o colesterol não é necessário nem para a ligação da proteína à membrana-alvo nem para a inserção e/ou formação do poro, o que coloca então a leishporina na classe das citolisinas que independem de colesterol para lisar a célula-alvo. No entanto, ele interfere de forma negativa na formação de poros pela citolisina, de alguma forma interferindo na susceptibilidade da membrana à formação do poro. É sabido que o colesterol influencia diretamente na fluidez da membrana. Sendo assim, é possível, e bastante plausível, que o colesterol confira maior rigidez às membranas, o que poderia dificultar a inserção de moléculas na bicamada lipídica. É possível ainda que o colesterol, além de determinadas concentrações, dificulte a mobilidade de possíveis subunidades de leishporina (ainda que inseridas) o que dificultaria o encontro das mesmas para que haja a “polimerização” e a conseqüente formação dos poros. Dados da literatura mostram que a composição lipídica, incluindo a alta concentração de colesterol, está envolvida na resistência de alguns organismos às suas próprias hemolisinas, sendo muitas vezes o próprio colesterol um modulador negativo para a citólise. Este fenômeno foi descrito para o protozoário patogênico *Entamoeba histolytica* (Ändra et al., 2004). Como mostrado pelos autores, a permeabilização de lipossomos pelos peptídeos formadores de poros desse protozoário era tanto menor quanto maior a quantidade de colesterol presente nas vesículas e, devido a altas concentrações de colesterol em suas membranas (40%), as amebas que produzem esses peptídeos citolíticos são imunes à autólise. Com relação à *Leishmania*, resultados anteriores do nosso grupo indicaram que é possível que a composição lipídica do parasita também o proteja da autólise, já que a leishporina é capaz de se ligar às promastigotas, mas não causam sua lise (Almeida-Campos, 2001). Vale a pena mencionar que o colesterol, em membranas naturais, está assimetricamente distribuído, localizado principalmente em *lipid-rafts*, realidade muito diferente da que ocorre nas

membranas dos lipossomos nas quais o colesterol encontra-se simetricamente difundido pela bicamada.

Resultados anteriores mostraram que nos extratos do parasita que utilizamos, co-existem formas ativas e inativas da leishporina. Mostramos ainda que a citolisina é ativada pela remoção de um oligopeptídeo inibidor ligado de forma não covalente à molécula ativa, o que pode ser alcançado tanto por digestão proteolítica quanto por agentes dissociantes que removem esta molécula (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010). Aqui, nós mostramos que proteases presentes no próprio Ext-ms utilizado também eram capazes de ativar a leishporina (Fig. 11). Resultados anteriores sugeriram que tanto a forma ativa quanto a forma inativa eram capazes de se ligar a lipídeos (Almeida-Campos et al., 2010), o que foi, de fato, verificado no presente trabalho, utilizando a ativação intrínseca ao próprio extrato. Inicialmente, verificamos que após uma primeira remoção da atividade hemolítica com um mínimo de lipossomos necessário para que toda a atividade lítica fosse removida, o sobrenadante ainda era capaz de “gerar” mais atividade hemolítica pela ação das serino-proteases do próprio parasita (Fig. 11), demonstrando que nesse sobrenadante as formas inativas ainda estavam presentes (Fig.11 e 12). No entanto, quando um excesso de lipossomos foi empregado, não houve geração de nova atividade (Fig. 13B). Desses resultados, duas hipóteses plausíveis eram: 1) a forma ativa se liga com maior afinidade aos lipídeos; 2) as formas inativas existem em maior quantidade no extrato do que as formas ativas. Para respondermos esta questão realizamos um ensaio no qual removemos toda a atividade lítica presente nos extratos do parasita com o mínimo de lipossomos necessário, de forma que no extrato só estivessem presentes as formas inativas da citolisina. A ativação da leishporina, mediada pelo agente dissociante g-HCl, feita em dois momentos diferentes, antes da ligação e depois da ligação da citolisina nas hemácias, nos mostrou que a primeira hipótese parece ser a correta. A dissociação do inibidor antes da ligação à membrana das hemácias produz um grande aumento na cinética de ligação da leishporina (Fig. 14A), e conseqüentemente na cinética de hemólise (Fig. 14B), quando comparada com a dissociação realizada depois da ligação às hemácias.

A formação de poros pela leishporina foi inicialmente demonstrada por técnicas de *patch-clamp*. Entretanto, não havíamos ainda visualizado a estrutura de poro nas membranas lisadas. Aqui, analisamos os dois modelos de membrana utilizados, hemácias e lipossomos para visualizar os poros, utilizando uma técnica de alta

resolução, que vem sendo amplamente utilizada para visualização de estruturas em biomembranas, que é a Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy - AFM). Por AFM, mais especificamente a *Tapping mode technique*, vários grupos vêm demonstrando o efeito de citolisinas e PFPs na topografia das membranas lisadas por essas moléculas. Abordagens utilizando-se AFM *Tapping-mode technique* foram bem sucedidas tanto para se visualizar pequenos poros medindo cerca de 2 nm de diâmetro, como observado para as *OmpF Porin* de bactérias (Philippsen et al., 2002) quanto para PFPs que produzem poros maiores como a perfringolisina O de *Clostridium perfringens* cujos poros medem cerca de 40 nm de diâmetro (Czajkowsky et al., 2004).

A abordagem de *Tapping mode AFM* permitiu-nos visualizar estruturas bem definidas e de características homogêneas que se assemelham a poros, medindo, em sua maioria, de 25-100 nm de diâmetro tanto na superfície de hemácias lisadas (Fig. 15) quanto em filmes lipídicos feitos a partir de lipossomos de DPPC (Figs. 16 a 18) (diâmetros menores e maiores foram também observados). O fato de que membranas de hemácias e filmes lipídicos de lipossomos de DPPC intactos que haviam sido incubados com Ext-ms fervido ou de DOPC, que não são susceptíveis à lise pela leishporina, não mostrarem essas estruturas *pore-like*, indicam que elas tenham sido causadas pela leishporina do Ext-ms. Por si só, essas estruturas apresentando essas dimensões (diâmetro e profundidade) seriam, certamente, mais que suficientes para passagem de moléculas de água (e até mesmo da própria hemoglobina), tendo muito provavelmente sido a causa da lise das hemácia e dos lipossomos utilizados.

Esses resultados estão de acordo com resultados anteriores de nosso grupo que mostraram que os poros aumentam de tamanho em função do tempo de incubação com o extrato e em função de sua concentração e cujo tamanho mínimo seria de cerca de 1,6 nm (Noronha et al., 2000). Esse aumento pode ser tanto a consequência da adição de subunidades individuais (“monômeros”) de leishporina quanto da coalescência de vários poros distintos, já formados, como mostram as imagens, onde duas estruturas similares se fundem ou quase fundem (Figs. 16D e 17C). Essas estruturas *pore-like* de diâmetros variáveis apresentaram, no entanto, homogeneidade quanto à suas profundidades (distâncias verticais) sempre em torno de 6-8 nm, dimensões condizentes com a espessura de bicamadas lipídicas, que é de ~ 7 nm (Figs. 15G e 15J, 16E – 17B e 18B). O aspecto das formações observadas, as dimensões encontradas, a consistência de nossos dados e a comparação com dados da literatura vindos de outros grupos que,

utilizando a mesma técnica de microscopia, mostraram estruturas semelhantes para outras citolisinas formadoras de poros, atestam a confiabilidade de nossa interpretação .

O fato da leishporina se ligar a membranas de lipossomos causando sua lise e de termos visualizado por AFM os danos por ela provocados nos fez acreditar ser possível utilizar lipossomos como ferramenta de purificação da citolisina a partir dos extratos líticos do parasita. Uma vez tendo mostrado que lipossomos (contendo ou não colesterol) removiam a atividade hemolítica de extratos de promastigotas de *L. amazonensis*, e que a leishporina se ligava a eles foi óbvio pensar que pudéssemos seletivamente purificar a leishporina do Ext-ms. De fato, 5 proteínas do Ext-ms se ligaram aos lipossomos nas condições utilizadas (Fig. 19A), das quais 4 foram identificadas por *fingerprint* dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massas e pelo seqüenciamento de alguns desses peptídeos (Fig. 19C). Estas foram a abundante protease de membrana gp63, a  $\beta$ -tubulina (50kDa), a também abundante gp46, uma proteína presente em algumas espécies de *Leishmania* e a enzima da via glicolítica GAPDH (39kDa), todas com *matches* no gênero *Leishmania*. É possível assim, que uma ou mais dessas proteínas esteja(m) de alguma forma envolvidas com a lise mediada pelo que chamamos de leishporina. Dessas proteínas é interessante ressaltar que a GP46 não possui função conhecida e que a GAPDH foi recentemente estudada como uma molécula importante na indução do entumescimento e permeabilização de mitocôndrias com perda do seu potencial transmembrana interno culminado com a liberação de proteínas pro-apoptóticas como o citocromo c e AIF (*apoptosis-inducing factor*), bem como da lise de lipossomos (Tarze et al., 2007). É possível assim, que a GAPDH possa ter papel semelhante em *Leishmania*. Trabalhos anteriores do nosso grupo já haviam demonstrado que a gp46 ancorada à membrana de *L. amazonensis* não tem qualquer participação na lise mediada pela leishporina. No entanto, Tonui et al. (2004) mostraram que a gp46 também pode se apresentar sob forma solúvel e pode aparecer em meios de culturas de *Leishmania major*, o que pode colocar a gp46 solúvel como uma candidata a participar da citólise mediada pela leishporina.

Resultados anteriores mostraram que a leishporina parece se apresentar como uma forma hemoliticamente inativa que pode ser ativada ou por proteólise ou por dissociação de um oligopeptídeo não covalentemente ligado à citolisina (Almeida-Campos & Horta, 2000; Almeida-Campos, 2001). No extrato total, foi demonstrado que a ativação da leishporina é mediada por serino-proteases solúveis do próprio extrato, por



serino-proteases exógenas e por agentes dissociantes (Almeida-Campos & Horta, 2000). Posteriormente foi mostrado que a ativação consiste na remoção de um provável peptídeo inibidor da atividade citolítica (Almeida-Campos et al., 2010). No presente trabalho, nós verificamos que a ativação da leishporina também podia ser mediada por uma serino-protease presente no Ext-ms aqui utilizado (Fig. 11). De fato, há relatos recentes sobre a presença de serino-proteases em frações de membranas de *L. amazonensis* (Silva-Lopez et al., 2004; Morgado-Dias et al., 2005). Esses dados nos fizeram pensar em outra abordagem para capturar apenas a leishporina utilizando as diferenças de afinidade de ligação a lipossomos entre formas ativas e inativas observadas e discutidas anteriormente (Figs. 11-14) A estratégia seria remover a atividade hemolítica de Ext-ms com lipossomos e com ela quaisquer proteínas não relacionadas ao processo lítico que porventura se ligasse ao lipossomo e, em seguida, incubar o extrato hemoliticamente inativo a 37 °C para que as formas inativas ainda presentes no Ext-ms fossem ativadas. Desta forma seria esperado que, em uma segunda remoção da atividade hemolítica só a leishporina ativa se ligaria aos lipossomos. Com essa estratégia, apenas uma molécula protéica de 48 kDa foi co-removida com a atividade hemolítica gerada (Fig. 19B). Embora essa proteína ainda não tenha sido identificada é provável, que ela seja a própria gp46 identificada anteriormente juntamente com outras proteínas nos lipossomos que removeram a atividade inicial de Ext-ms (Fig. 19A) o que, mais uma vez, leva a nossa atenção para esta proteína.

Ainda com os métodos clássicos de purificação por cromatografia, o que nos permitiria purificar a citolisina e identificá-la, ainda seria possível removê-la seletivamente por lipossomos de frações ativas purificadas ou semi-purificadas, o que poderia nos apontar para uma mesma proteína já identificada anteriormente. Utilizamos as técnicas de troca iônica, filtração molecular e fase reversa, em dois protocolos diferentes: um partindo do Ext-ms e iniciando com a trôca iônica (Figs. 20-28) e outro partindo do Ext-ms ativado por g-HCl, iniciando com a filtração molecular (Figs. 38-40), este último, com a intenção de maximizar as formas ativas da leishporina. O resultado do primeiro protocolo, por si só nos indica a existências de pelo menos três diferentes estruturas moleculares líticas no extrato do parasita de cargas distintas separadas durante a cromatografia de troca iônica (Fig. 20). As cinco frações hemolíticas obtidas da filtração molecular (uma da F1, duas da F2 e duas da F3, (Figs. 21, 23 e 23) foram eluídas em duas posições distintas: uma antes (F1, F2A e F3A, Figs. 21, 22 e 23) e outra próximo (F2B e F3B, Figs. 22 e 23) da região onde elui a albumina

(65 kDa), indicando moléculas de mais alto peso molecular. A cromatografia de fase reversa de cada uma dessas frações individualmente deu origem a um total de 11 frações líticas distintas (Figs. 24-28). Um fato interessante é o de que proteínas de pesos moleculares aparentemente idênticos (um dublete de cerca de 60 kDa) sempre se separaram em diferentes frações líticas provenientes das cromatografias de troca iônica, de filtração molecular e de fase reversa (F1.3, F2A.5 e F2B.7), achado recorrente nas repetições que realizamos dos processos cromatográficos. Nas oito frações líticas restantes não foi possível visualizar nenhuma proteína (Fig 29). Uma dessas proteínas (a da fração F1.3 dos géis das Figs. 29 e 30) foi identificada como HSP70 de *L. amazonensis* por análise do *fingerprint* de peptídeos trípticos e do seqüenciamento desses peptídeos (ver anexo de espectros) por espectrometria de massas, revelou que a proteína de 60 kDa é a Heat-Shock Protein 70 (HSP70) de *L. amazonensis* (Fig 31). É possível que as outras sejam também a HSP70 e o que as faz eluir em pontos distintos em todas as cromatografias seja diferenças de tamanho, carga e hidrofobicidade, o que poderia ser explicado pela existência de isoformas ou ainda que elas estejam diferentemente associadas a outras moléculas como lipídeos e carboidratos.

A HSP70 é uma proteína extremamente conservada nos diferentes organismos, apresentando atividade de chaperone e sendo produzida quando a célula encontra-se mediante algum stress. Dados da literatura mostram que essa proteína é heterogênea entre as diferentes espécies de *Leishmania* (Arora et al., 1998). Em *L. amazonensis*, são produzidas por um grupo de genes cuja sequencia guarda 95% de similaridade com *L. major* e *L. donovani* (Bock & Langer, 1998) e, em *L. braziliensis*, já foi demonstrado que são também secretadas por promastigotas (Cuevo et al., 2009). Em *L. infantum*, foi mostrado que essa proteína é essencial para a virulência do parasita. Um fato interessante é que células tumorais expressando esta proteína em sua isoforma humana tornam-se permeáveis à granzima B de linfócitos citotóxicos por um mecanismo independente da ação da perforina (Gross et al., 2003). O grupo autor deste trabalho demonstrou que esta permeabilização era mediada pela HSP70 e mostrou evidências de que ela pudesse ser formadora de canais ou de indutora da formação de canais. O fato de uma dessas frações hemolíticas contendo HSP70 (F1.3 - Fig. 29) ter tido sua atividade inibida por DPPC e de que a(s) proteína(s) de 60 kDa ter(em) sido removida(s) da fração juntamente com sua atividade hemolítica por lipossomos compostos deste mesmo lipídeo (Fig. 30), nos leva a considerar a HSP70 como outra possível candidata a participar da atividade lítica apresentada pelos parasitas. Ainda que

a HSP70 possa ter algum papel na atividade hemolítica de *L. amazonensis*, nossos resultados ainda apontam para outras possibilidades, uma vez que em várias frações líticas, e na maioria das vezes, nunca conseguimos observar a presença de proteínas. Como utilizamos géis de poliacrilamida de 10 a 12,5 %, pequenas moléculas com peso molecular abaixo de 10 kDa poderiam ter-nos escapado à visualização e análise. De fato, uma das frações provenientes da cromatografia de fase reversa (F2A.5) revelou, por espectrometria de massas, além das bandas de 60 kDa (Fig. 29), a presença de um peptídeo na cuja massa molecular é 6,3 kDa (Fig 32), mas cuja sequência de aminoácidos ainda não possuímos. Este peptídeo poderia ser mais uma molécula a compor um possível complexo lítico ou ser ainda produto de degradação.

O segundo protocolo de purificação que utilizamos mostrou que, de fato, estávamos perdendo a identificação de moléculas pequenas e, para nossa surpresa, as mesmas não eram protéicas. O segundo protocolo ainda foi idealizado para aumentar a quantidade de formas ativas no material inicial e para analisarmos as frações líticas ao espectrômetro de massas em suas totalidades, evitando a eletroforese e a perda de moléculas de baixo peso molecular. A subdivisão da atividade lítica inicial em várias frações líticas corroborava a existência de diferentes moléculas líticas ou de pequenas variações moleculares resultando na presença de isoformas líticas no Ext-ms. Sabendo que g-HCl remove uma molécula inibidora das formas ativas utilizamos este agente dissociante para aumentarmos a representatividade das moléculas ativas no material inicial até o final da primeira cromatografia que foi a filtração molecular. Desta vez, com o g-HCl que, na concentração utilizada, funciona como agente dissociante, a atividade hemolítica eluiu em uma única fração em torno da região que elui a albumina (65 kDa) (Fig. 38), como algumas das frações (F2B e F3B, Fig. 23) no protocolo anterior. Uma única fração também foi obtida após a cromatografia de troca iônica desta fração (Fig. 39), ao contrário do que observamos na ausência de g-HCl (Fig. 20). Apenas na última etapa que, como no primeiro protocolo, foi a cromatografia de fase reversa, obtivemos três frações cromatográficas distintas com atividade hemolítica (Fig.40). A análise direta das amostras tripsinizadas revelou moléculas pequenas, mas não encontramos nenhum peptídeo triptico, mesmo após uma busca intensa com todo o tipo de controle que pudemos fazer. Para nossa surpresa, apenas íons de M/Z 518 (em F3), 520 (F1, F2 e F3) (Figs 41 e 42) e 1039, este último, correspondente a um dímero do íon de M/Z 520, encontrado em uma das frações (F3) (Fig. 40) (espectros anexos). Estas moléculas, quando fragmentadas, foram identificadas por suas cargas como sendo

dois lisofosfolípídeos de fosfatidilcolina, um de ácido linoléico e outro de ácido linolênico (Figs. 43 e 44). Este resultado indica que essas lisofosfatilcolinas sejam as moléculas formadoras de poros presentes em Ext-ms de *L. amazonensis*, uma vez que foram as únicas moléculas líticas encontradas ao final desse protocolo de cromatografia. No entanto, devemos ainda estar atentos à possibilidade de que alguma proteína que por si só seja lítica tenha sido inativada durante o processo de cromatografia no qual as moléculas passaram pelo contato com g-HCl seguida de acetonitrila.

Este resultado foi inusitado para nós, uma vez que sempre procurávamos por um composto protéico. No entanto, mostrou-se, na verdade, bem interessante, pois, de fato, os lisofosfolípídeos são compostos descritos na literatura como líticos (Tanaka et al., 1983; Zhou et al., 2006), inclusive, como formadores de poros detectáveis por *patch-clamp* (Wilson-Ashworth et al. 2004). Essas moléculas são capazes de despolarizar membranas (Caccin et al., 2010) e induzir o influxo de íons cálcio em macrófagos (Ogita et al., 1997). Um fato interessante é que a lise de eritrócitos por contato com tripomastigotas de *T. cruzi* é mediada pela transferência de lisofosfolípídeos do parasita ao eritrócito (Luján & Bronia, 1994). Lisofosfolípídeos já foram detectados e caracterizados em *Leishmania* e dados da literatura mostram que as cadeias de ácidos graxos insaturados que identificamos (linoléico e linolênico) são, de fato, os ácidos graxos insaturados mais abundantes em *Kinetoplastidae*, sendo também descritos em *Leishmania tarentolae* como os mais abundantes (Meyer & Holz, 1966).

Tentando interpretar os nossos dados, à luz deste achado, é interessante observar que, originalmente, a atividade hemolítica de Ext-ms encontrava-se em uma molécula ou complexo de tamanho muito maior do que o equivalente do peso molecular das lisofosfatidilconinas que, caso estivessem livres nos extratos eluiriam, por exclusão molecular, em baixíssimo peso molecular. Na etapa de filtração molecular (primeira ou segunda etapa, dependendo do protocolo), a atividade lítica sempre eluía na faixa de peso molecular mais alto. Portanto, se as lisofosfatidilconinas líticas forem as unidades responsáveis pela atividade hemolítica do Ext-ms, eles devem estar originalmente complexados com outra molécula, possivelmente uma proteína, ou em um complexo lipídico de um grande número de moléculas (posto que sua massa molecular é em torno 0,5 kDa). Em ambos os casos o possível complexo teria se desfeito na presença de acetonitrila aliado ao tratamento prévio com g-HCl. Ainda que não tenhamos analisado todo o conteúdo das frações provenientes das cromatografias na ausência de g-HCl (analisamos apenas as bandas protéicas provenientes do gel), é

interessante notar que os pontos de eluição de várias frações F2A.4 (62%), F2B.6 (62%), F3A.9 (62%), F3A.10 (68%) e F3B.11 (62%) (Fig. 25 a 28) são os mesmos pontos de eluição de duas das amostras contendo os lisofosfolípídeos (62% e 68%), o que é compatível com a idéia de que a molécula lítica original presente em Ext contenha esses lipídeos. Uma possível interação dos lipídeos líticos com outras moléculas, como proteínas, formando complexos líticos com diferentes conteúdos lipídicos e/ou protéicos poderia explicar o fato de que, sem g-HCl, a atividade hemolítica se distribui em diversas frações, ao passo que uma possível dissociação poderia desfazer essas interações tornando as moleculares líticas mais homogêneas.

Resultados anteriores do nosso grupo haviam mostrado que, durante a ativação da leishporina pela ação de proteases, a atividade lítica em Ext-ms cresce na proporção inversa de seu conteúdo protéico (Almeida-Campos, 2001). No presente trabalho também mostramos que a proteólise mediada por serino-proteases do próprio parasita aumenta a atividade lítica de Ext-ms (Fig. 11). O aumento da atividade lítica por proteólise poderia nos indicar, no mínimo, três possibilidades não excludentes entre si: 1) a molécula é protéica e resistente à digestão proteolítica, 2) peptídeos gerados pela protease ainda apresentariam atividade lítica e 3) a atividade lítica é mediada por moléculas não protéicas, mas são inibidas por proteínas ou peptídeos. De fato, os extratos do parasita não perdem a atividade lítica com o tratamento com proteinase-K em altas doses (Figs. 33 e 37 inserto). Em outros experimentos nem mesmo 1 mg/mL dessa protease foi capaz de destruir a atividade lítica, embora, por outro lado, resultados anteriores tenham mostrado que a atividade hemolítica de extratos reduz consideravelmente com o tratamento com tripsina (Noronha et al., 1996). É possível que nos extratos tratados com proteinase K a atividade lítica final seja provocada por uma molécula lítica de natureza não protéica, provavelmente os lisofosfolípídeos aqui identificados. Um dado interessante e que corrobora esta hipótese é que a razão M/Z apresentada pelo íon mais abundante da segunda fração de atividade obtida da cromatografia de fase-reversa do Ext-ms tratado com proteinase-K (Fig 37 e Tabela 3) é de 1039, exatamente a esperada para o dímero do lisofosfolípídeo de M/Z 520. É também interessante notar que na cromatografia de fase reversa de Ext-ms tratado com proteinase K (Fig. 37), os picos de atividade não apresentaram absorbância a 280 nm e sim a 214, o que é mais um indicativo da ausência de moléculas protéicas.

É intrigante notar que a leishporina, quando estudada diretamente em extratos de membrana de promastigotas de *L. amazonensis*, comporta-se invariavelmente como

uma proteína: sua atividade hemolítica é termolábil e sensível à tripsina (Noronha et al., 1996 e Figs. 8, 15A, 17A e 35). No entanto, após o tratamento com proteinase K, que mesmo em altas doses, em nossos experimentos, não altera a atividade hemolítica de Ext-ms, o aquecimento a 100 °C não afeta esta atividade (Fig. 35), indicando mais uma vez que a molécula lítica não é protéica. De forma semelhante, o aquecimento não abole a atividade lítica dos lisofosfolípidos purificados e identificados neste trabalho (Fig. 45). Por outro lado, lipossomos de DPPC removem a atividade hemolítica do Ext-ms tanto recém-preparado (Figs. 4B, 5 e 7), como após a digestão com proteinase K (Fig. 35), como ainda dos lisofosfolípidos líticos (Fig. 45). É então possível que esses lisofosfolípidos sejam os responsáveis pela atividade lítica do parasita. A fervura dos extratos e os tratamentos com tripsina, ambos gerando e/ou expondo núcleos protéicos hidrofóbicos, neste caso, não aboliriam, mas sim inibiriam a atividade dos lipídeos que possuem afinidade por moléculas hidrofóbicas. De fato, resultados preliminares mostraram que o Ext-ms recém-preparado é inativado após fervura, recupera imediatamente sua atividade ao ser incubado com 500 mM de g-HCl como agente dissociante. Este tratamento reverteria, então, a inibição da atividade lítica dos lipídeos pelos núcleos hidrofóbicos das proteínas desnaturadas.

Nossas tentativas de purificação da leishporina nos levaram a alguns resultados não esperados e outros não conclusivos. No entanto, o fato de termos conseguido purificar dois tipos de lisofosfatidilcolina hemolíticos, e analisando este resultado à luz de outros resultados deste trabalho e de resultados anteriores, nos fez pensar em pelo menos duas hipóteses que poderiam explicar esse aparente paradoxo:

- 1) as lisofosfatidilcolinas líticas estariam organizadas em complexos lipoproteicos também líticos, nos quais uma proteína agiria como uma carreadora e/ou concentradora dos lisofosfolípidos líticos. Neste modelo, tanto a fervura quanto a tripsinólise destruiria uma parte fundamental do complexo sem, no entanto, liberar os lipídeos líticos. A liberação poderia ser obtida pela destruição total do possível carreador o que, em nossos experimentos, teria sido promovido pela ação da proteinase K, clivando a proteína em fragmentos tão pequenos que previne a interação, com os lipídeos, ou pela dissociação do mesmo pela ação do g-HCl, o que tornaria então a atividade hemolítica insensível ao calor (Fig. 35). Em qualquer uma das formas, livres ou complexados, os lisofosfolípidos líticos perdem sua atividade quando encontram seu ligante, por excelência, um fosfolípido como o DPPC. Se assim, de fato ocorrer,

este carreador poderia, no contexto do parasita, acumular funções de endereçamento/concentração/inibição da atividade lítica.

Dentro desta hipótese, e baseado em nossos resultados de que algumas proteínas, como a HSP70 e possivelmente a gp46 também se ligam nos lipossomos que removem a atividade hemolítica da leishporina é possível que essas proteínas possam ser a contraparte protéica da leishporina. Nesse sentido, é interessante mencionar que a HSP70 liga-se com alta afinidade a lisofosfatidilcolina como demonstrado por cromatografia de afinidade (Desmaret et al., 2005). No entanto, não estamos descartando a possibilidade, dentro desta hipótese, da participação de outras proteínas co-removidas com a atividade lítica de Ext-ms (Fig. 19) ou ainda outras que, por não apresentarem atividade hemolítica por si só, não foram identificadas nas frações cromatográficas (Figs. 24 a 28 e 40). Além disso, como não analisamos ao espectrômetro de massas todo o conteúdo das frações líticas contendo a HSP70 e, sim, as bandas protéicas após a eletroforese, outras moléculas poderiam então ter sido negligenciadas pela abordagem que utilizamos neste protocolo, por não estarmos atentos a moléculas de natureza não-protéica, como as lisofosfatidilcolinas líticas purificadas.

2) a atividade lítica de Ext-ms seria devida apenas às lisofosfatidilcolinas líticas, livres ou agregadas entre si, sendo, portanto, termo-resistentes. Neste modelo, a destruição da atividade lítica pela fervura ou tripsinólise não seria, necessariamente por desnaturação ou clivagem de uma proteína lítica. Os dois processos, que geram, respectivamente, proteínas desnaturadas ou grandes peptídeos (ao contrário da proteinase-K), poderiam estar abolindo a atividade hemolítica por atuarem expondo núcleos hidrofóbicos de quaisquer proteínas que, ligando-se aos lipídeos líticos, inibiriam sua ação. A proteinase K, neste contexto e por ser altamente inespecífica, geraria fragmentos protéicos de hidrofobicidade irrelevante, não abolindo então a atividade hemolítica do Ext-ms, por deixar os lipídeos líticos livres, insensíveis ao calor. A dissociação e liberação dos lipídeos líticos por g-HCl partindo-se de complexos inativos formados por proteínas desnaturadas pelo calor (resultado preliminar não mostrado) ou de grandes peptídeos (gerados por tripsinólise) recuperaria, então, a atividade lítica.

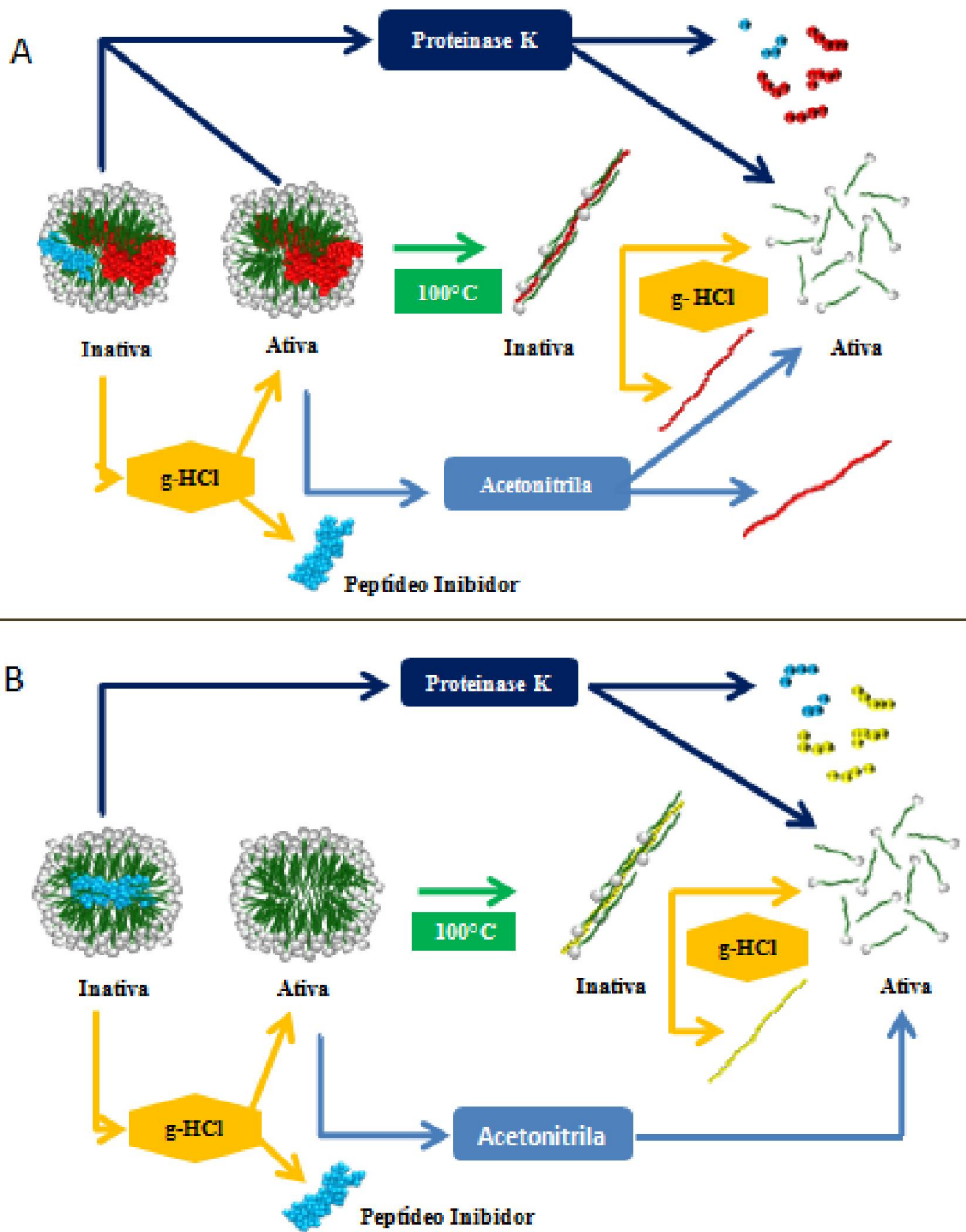
Em ambos os contextos, fariam parte das formas inativas do complexo lítico, um oligolipeptídeo inibidor associado a esta molécula, como já mostrado em trabalhos anteriores (Almeida-Campos, 2001; Almeida-Campos et al., 2010) que, se removido por

proteólise ou por dissociação, as ativar. A esquematização desses dois modelos propostos encontra-se na figura 46.

Lipoproteínas e lipopeptídeos líticos, alguns deles com atividade formadora de poros, tem sido relatados na literatura. Um exemplo bem conhecido é o fator tripanolítico humano que se trata de um grande complexo lipoprotéico com atividade lítica ótima em pH ácido (5,0) e que lisa também lipossomos (Harrington et al., 2009). Existem ainda alguns lipopeptídeos líticos, como as surfactinas, de *Bacillus subtilis* que são líticos para bactérias e hemácias (Heerklotz & Seelig, 2007). Outros exemplos de lipopeptídeos líticos são a siringomicina E e as siringopeptinas que são lipopeptídeos formadores de poros para cuja ação lítica o colesterol foi demonstrado como sendo um modulador negativo (Blasko et al., 1998 e Hutchison & Gross 1997). Outro exemplo interessante de lipopeptídeos formadores de poros são as iturinas, que apresentam como parte protéica de seu complexo um pequeno peptídeo de 7 aminoácidos composto apenas de resíduos de leucina e aspartato. Este complexo anfifílico forma poros e permeabiliza membranas numa ação dependente tanto da parte lipídica quanto da parte protéica do complexo (Maget-Dana & Peypoux, 1994).

De posse de pelo menos um tipo molecular lítico pela primeira vez identificado poderemos pensar em algum estudo funcional e na avaliação individual e conjunta de seu papel na atividade lítica produzida pelo parasita. Experimentos de co-imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-lisofosfatidilcolina poderão revelar se de fato há um complexo lipoprotéico e qual(quais) proteína(s) que interage(m) com os lisofosfolipídeos líticos. A curto e médio prazo, iremos investigar se a inibição das enzimas fosfolipase A1 e/ou A2 (enzimas geradoras de lisofosfolipídeos), tem algum efeito sobre a atividade hemolítica de *L. amazonensis*. Em achados recentes (Shimuta et al., 2009) ficou demonstrado que a atividade lítica secretada pela bactéria *Serratia marcescens* é resultado da ação direta de lisofosfolipídeos produzidos pela via da fosfolipase A1. Este tipo de experimento poderá nos fornecer respostas sobre o papel dos lisofosfolipídeos na atividade citolítica de *L. amazonensis* em extratos do parasita e também sobre sua importância para o parasita vivo frente à infecção de macrófagos *in vitro* ou infecção de camundongos. Tais estudos subsequentes nos permitirão uma análise focada sobre esses fatores líticos produzidos por *L. amazonensis* e sua eventual função na biologia deste parasita e na patogênese por ele causada.





**Figura 46 – Modelos possíveis para a leishporina de *L. amazonensis*** - Um complexo lipoprotéico inativo conteria, além de LPC,

- A) mais duas partes protéicas sendo uma delas o peptídeo inibidor (azul), que pode ser removido tanto por g-HCl quanto por proteólise (não mostrado), dando origem às formas ativas indicadas. A fervura desnaturaria a parte protéica (vermelho) do complexo ativo que deixaria de ser lítico. Esta forma inibida, no entanto, poderia ser re-ativada por dissociação das LPC por g-HCl. Tanto a proteólise quanto os tratamentos com g-HCl seguidos ou não do tratamento com acetoneitrila liberariam as LPCs líticas.
- B) um peptídeo inibidor (azul) que pode ser removido tanto por g-HCl quanto por proteólise (não mostrado), dando origem às formas ativas indicadas. A fervura desnaturaria proteínas não relacionadas presentes no Ext-ms (amarelo), as LPC líticas seriam inibidas por se ligarem aos núcleos hidrofóbicos expostos destas proteínas (amarelo) podendo, no entanto, ser re-ativadas por dissociação por g-HCl. Tanto a proteólise quanto os tratamentos com g-HCl, seguido ou não do tratamento com acetoneitrila liberariam as LPCs líticas.

Em ambos os modelos, as proteínas dissociadas ou peptídeos digeridos encontram-se esquematizados nas cores azul e amarela.

## 5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLI, O.A.; GAO L.Y.; PEDERSEN L.L.; ZINK S.; RADULIC M.; DORIC M.; ABU KWAIK Y. Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. **Infect Immun.** Nov **68(11):6431-40, 2000.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R. Leishporina, uma proteína formadora de poros de *Leishmania*: mecanismos de ativação, de ligação à célula alvo e de resistência do parasita à autólise. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, **2001.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; HORTA, M. F. Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. **Molecular and Biochemical Parasitology.** Vol. **111**, No. **2**, P. **363 - 375, 2000.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; NORONHA, F. S. M.; HORTA, M. F. The multitalented pore-forming proteins of intracellular pathogens. **Microbes and Infection.** Vol. **4**, No. **7**, P. **741 - 750, 2002.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; CASTRO-GOMES, T.; FRÉZARD, F.; HORTA, M. F. Activation of *Leishmania spp* leishporin: evidence that dissociation of an inhibitory oligopeptide not only improves its lipid-binding efficiency but also endows it with the ability to form pores. **2010, Submitted.**

AMINO, R.; MARTINS, R. M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; SCHENKMAN, S. Trialysin, a novel pore-forming proteins from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. **The Journal of Biological Chemistry.** Vol. **277**, No. **8**, P. **6207-6213, 2002.**

ANDRÄ, J.; BERNINGHAUSEN, O.; LEIPPE, M. Membrane lipid composition protects *Enatamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming proteins. **FEBS Letters.** Vol. **564**, P. **109-115, 2004.**

ANDREWS NW, ABRAMS CK, SLATIN SL, GRIFFITHS G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell. Jun 29;61(7):1277-87,1990.**

ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Med Biol Res. Feb, Vol. 27(2) P. 471-5, 1994.**

ANDREWS, N. W. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol. Aug, Vol. 71(2) P. 241-4, 1990.**

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol Biochem Parasitol. Mar 15, Vol. 33(3), P. 249-56, 1989.**

ARORA SK, KAPOOR GS, SEHGAL S. Heterogeneity in heat shock protein genes in *Leishmania* isolates. **Immunol Cell Biol. Apr;76(2):186-9, 1998.**

BALLARD J.; SOKOLOV Y.; YUAN W. L.; KAGAN B. L.; TWETEN R. K. Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. **Mol Microbiol. Vol. 10(3) P. 627-34, 1993.**

BHAKDI S.; TRANUM-JENSEN, J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. **Prog Allergy. Vol. 40, P. 1-43, 1988.**

BIELECKI J.; YOUNGMAN P.; CONNELLY P.; PORTNOY D.A. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. **Nature. May 10; 345(6271):175-6, 1990.**

BLASKO K, SCHAGINA LV, AGNER G, KAULIN YA, TAKEMOTO JY. Membrane sterol composition modulates the pore forming activity of syringomycin E in human red blood cells. **Biochim Biophys Acta. Aug 14;1373(1):163-9, 1998.**

BOCK JH, LANGER PJ. Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. **Mol Biochem Parasitol. Dec;62(2):187-97, 1993.**

BRACHA R, NUCHAMOWITZ Y, MIRELMAN D. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. **Eukaryot Cell.** Apr;2(2):295-305, 2003.

BRAY RS. Note on the history of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean and Middle East area. **Parassitologia.** May-Dec;29(2-3):175-9, 1987.

BURCHMORE RJ, BARRETT MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. **Int J Parasitol.** Oct;31(12):1311-20, 2001.

CACCIN P, MAGNABOSCO A, TEDESCO E, SILVA-CARDOSO L, ATELLA GC, MONTECUCCO C. Lysophospholipids are evolutionary ancient venom components. **Toxicon.** Jul 6, 2010.

CAMPAGNA S, SAINT N, MOLLE G, AUMELAS A. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. **Biochemistry.** Feb 20;46(7):1771-8, 2007.

CASTRO-GOMES T, ALMEIDA-CAMPOS FR, CALZAVARA-SILVA CE, DA SILVA RA, FRÉZARD F, HORTA MF. Membrane binding requirements for the cytolytic activity of *leishmania amazonensis* leishporin. **FEBS Lett.** Oct 6;583(19):3209-14, 2009.

CASTRO-GOMES, T.; ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; FREZARD, F., NUNES, A. C.; NORONHA, F. S. M.; HORTA, M. F. Activation of *Leishmania amazonensis* leishporin makes the cytolytin able to bind to cell membrane lipids. Publicado nos Anais do **XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia – XXXI Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 2004.**

CHANTURIYA A, YANG J, SCARIA P, STANEK J, FREI J, METT H, WOODLE M. New cationic lipids form channel-like pores in phospholipid bilayers. **Biophys J.** Mar;84(3):1750-5, 2003.

CHENG Y, LIU M, LI R, WANG C, BAI C, WANG K. Gadolinium induces domain and pore formation of human erythrocyte membrane: an atomic force microscopic study. **Biochim Biophys Acta.** Oct 15;1421(2):249-60, 1999.

CUERVO P, DE JESUS JB, SABOIA-VAHIA L, MENDONÇA-LIMA L, DOMONT GB, CUPOLILLO E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **J Proteomics**. Nov 2;73(1):79-92, 2009.

CZAJKOWSKY DM, HOTZE EM, SHAO Z, TWETEN RK. Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. **EMBO J**. Aug 18;23(16):3206-15, 2004.

DA SILVA LOPEZ RE, DE SIMONE SG. A serine protease from a detergent-soluble extract of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Z Naturforsch C**. Jul-Aug;59(7-8):590-8, 2004.

DA SILVA-LOPEZ RE, GIOVANNI-DE-SIMONE S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. **Exp Parasitol**. Jul-Aug;107(3-4):173-82, 2004.

DESMARET S, QIAN L, VANLOO B, MEERSCHAERT K, VAN DAMME J, GROOTEN J, VANDEKERCKHOVE J, PRESTWICH GD, GETTEMANS J. Lysophosphatidic acid affinity chromatography reveals pyruvate kinase as a specific LPA-binding protein. **Biol Chem**. Nov;386(11):1137-47, 2005.

ECKER A, PINTO SB, BAKER KW, KAFATOS FC, SINDEN RE. *Plasmodium berghei*: plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. **Exp Parasitol**. Aug;116(4):504-8, 2007.

FLANAGAN JJ, TWETEN RK, JOHNSON AE, HEUCK AP. Cholesterol exposure at the membrane surface is necessary and sufficient to trigger perfringolysin O binding. **Biochemistry**. May 12;48(18):3977-87, 2009.

FRÉZARD F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz J Med Biol Res**. Feb;32(2):181-9, 1999.

GAO, L. Y. AND KWAIK, Y. A. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. **Environmental Microbiology**. Vol. 2(1), P. 79-90, 2000.

GOUAUX, E. Channel-forming toxins: tales of transformation. **Current Opinion in Structural Biology**. Vol. 7, P. 566-573, 1997.

GRIMALDI Jr., G. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the world current concepts and implications for future research. **Clinical and Microbiology**. Vol. 6, P. 230-250, 1993.

GROSS C, KOELCH W, DEMAIO A, ARISPE N, MULTHOFF G. Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme. **B. J Biol Chem**. Oct 17;278(42):41173-81, 2003.

HAIDER MZ, KNOWLES BH, ELLAR DJ. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. colmeri insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. **Eur J Biochem**. May 2;156(3):531-40, 1986.

HAIDER MZ, KNOWLES BH, ELLAR DJ. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. colmeri insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. **Eur J Biochem**. May 2;156(3):531-40, 1986.

HANDMAN E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv Parasitol**.44:1-39, 1999.

HARRINGTON JM, HOWELL S, HAJDUK SL. Membrane permeabilization by trypanosome lytic factor, a cytolytic human high density lipoprotein. **J Biol Chem**. May 15;284(20):13505-12, 2009.

HECHT, O.; VAN NULAND, N. A.; SCHLEINKOFER, K.; DINGLEY, A. J.; BRUHN, H.; LEIPPE, M.; GROTZINGER, J. Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. **J. Biol. Chem**. Vol. 279(17), P. 17834-41, 2004.

HEERKLOTZ H, SEELIG J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. **Eur Biophys J**. Apr;36(4-5):305-14, 2007.

HELSEL AJ, BROWN AL, YAMATO K, FENG W, YUAN L, CLEMENTS AJ, HARDING SV, SZABO G, SHAO Z, GONG B. Highly conducting transmembrane pores formed by aromatic oligoamide macrocycles. **J Am Chem Soc**. Nov 26;130(47):15784-5, 2008.

HERBST, R.; MARCIANO-CABRAL, F.; LEIPPE, M. Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. **J. Biol. Chem.** Vol. 279(25), P. 25955-25958, 2004.

HERTLE, R. *Serratia marcescens* hemolysin (Sh1A) binds artificial membranes and forms pores in a receptor-independent manner. **Journal of membrane biology.** Vol. 189, P. 1-14, 2002.

HEUCK, A. P.; HOTZE, E. M.; TWETEN, R. K.; JOHNSON, A. E. Mechanism of membrane insertion of a multimeric b-barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformation changes. **Molecular Cell.** Vol. 6, P. 1233-1242, 2000.

HORTA, M. F. Pore-Forming Proteins In Pathogenic Protozoan Parasites. **Trends in Microbiology.** Vol. 5, No. 9, P. 363-366, 1997.

HUTCHISON ML, GROSS DC. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. **Mol Plant Microbe Interact.** Apr;10(3):347-54, 1997.

ISHINO, T.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. A plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the live sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. **Cellular Microbiology.** Vol. 7(2), P. 199-208, 2005.

KAFSACK BF, PENA JD, COPPENS I, RAVINDRAN S, BOOTHROYD JC, CARRUTHERS VB. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. **Science.** Jan 23;323(5913):530-3, 2009.

KAISER, K.; CAMARGO, N.; COPPENS, I.; MORRISEY, J. M.; VAIDYA, A. B.; KAPPE, S. H. I. A member of a conserved *Plasmodium* protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. **Molecular and biochemical parasitology.** Vol. 133, P. 15-26, 2004.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (eds.) The leishmaniasis in biology and medicine: biology and epidemiology. **London Academic Press. Vol 1, chap.1, P. 1-120, 1987.**

LAL K, PRIETO JH, BROMLEY E, SANDERSON SJ, YATES JR 3RD, WASTLING JM, TOMLEY FM, SINDEN RE. Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles; an ookinete microneme proteome. **Proteomics. Mar;9(5):1142-51, 2009.**

LEIPPE M.; EBEL S.; SCHOENBERGER O.L.; HORSTMANN R.D.; MULLER-EBERHARD H.J. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proc Natl Acad Sci U S A. Vol. 88(17), P. 7659-63, 1991.**

LEIPPE, M. Amoebapores. **Parasitology Today. Vol. 13, No. 5, 1997.**

LEY V, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V, ANDREWS NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J Exp Med. Feb 1;171(2):401-13, 1990.**

LIEW FY, O'DONNELL CA. Immunology of leishmaniasis. **Adv Parasitol. 32:161-259, 1993.**

LUDWIG, A. Cytolytic toxins from gram-negative bacteria. **Microbiologia. Vol. 12(2), P. 281-96, 1996.**

LUIJÁN HD, BRONIA DH. Intermembrane lipid transfer during *Trypanosoma cruzi*-induced erythrocyte membrane destabilization. **Parasitology. Apr;108 ( Pt 3):323-34, 1994.**

LUNDBERG, U.; VINATZER, U.; BERDNIK, D.; VON GABAIN, A.; BACCARINI, M. Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. **J Bacteriol. Vol. 181(11), P. 3433-7, 1999.**

MAGET-DANA R, PEYPOUX F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. **Toxicology. Feb 28;87(1-3):151-74. Review, 1994.**



MANGONI ML, SAUGAR JM, DELLISANTI M, BARRA D, SIMMACO M, RIVAS L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **J Biol Chem.** Jan 14;280(2):984-90, 2005.

MCCLELLAND D, EVANS RM, ABIDIN I, SHARMA S, CHOUDHRY FZ, JASPARS M, SEPCIĆ K, SCOTT RH. Irreversible and reversible pore formation by polymeric alkylpyridinium salts (poly-APS) from the sponge *Reniera sarai*. **Br J Pharmacol.** Aug;139(8):1399-408, 2003.

MEYER H, HOLZ GG JR. Biosynthesis of lipids by kinetoplastid flagellates. **J Biol Chem.** Nov 10;241(21):5000-7, 1966.

MOLMERET, M. AND KWAIK, Y. A. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell ? **Trends in Microbiology.** Vol. 10, No. 6, P. 258-260, 2002.

MORGADO-DÍAZ JA, SILVA-LOPEZ RE, ALVES CR, SOARES MJ, CORTE-REAL S, DE SIMONE SG. Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Jul;100(4):377-83, 2005.

NAKAMURA, M.; SEKINO, N.; IWAMOTO, M.; OHNO-YWASHITA, Y. Interaction of  $\theta$ -toxin (Perfringolisina O), a cholesterol-binding cytolysin, with liposomal membranes: changes in the aromatic side chains upon binding and insertion. **Biochemistry.** Vol. 34, P. 6513-6520, 1995.

NORONHA, F. S. M. Identificação, caracterização e purificação de uma proteína formadora de poros de *Leishmania amazonensis*. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 1996.**

NORONHA, F. S. M.; CRUZ, J. S.; BEIRÃO, P. S. L.; HORTA, M. F. Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane. **Infection and Immunity.** Vol. 68, No. 8, P.4578 - 4584, 2000.

NORONHA, F. S. M.; RAMALHO-PINTO, F. J.; HORTA, M. F. Cytolytic Activity In The Genus *Leishmania*: Involvement Of A Putative Pore-Forming Protein. **Infection and Immunity.** Vol. 64, P. 3975 - 3982, 1996.

NORONHA, F. S. M.; RAMALHO-PINTO, F. J.; HORTA, M. F. Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res. Vol. 27 P. 477-482, 1994.**

OGITA T, TANAKA Y, NAKAOKA T, MATSUOKA R, KIRA Y, NAKAMURA M, SHIMIZU T, FUJITA T. Lysophosphatidylcholine transduces Ca<sup>2+</sup> signaling via the platelet-activating factor receptor in macrophages. **Am J Physiol. Jan;272(1 Pt 2):H17-24, 1997.**

OJCIUS, D. M. AND YOUNG, J. D.-E A role for pore-forming proteins in the pathogenesis by parasites? **Parasitol Today. Vol. 6(5), P. 163-5, 1990.**

PALMER M, WELLER U, MESSNER M, BHAKDI S. Altered pore-forming properties of proteolytically nicked staphylococcal alpha-toxin. **J Biol Chem. Jun 5;268(16):11963-7, 1993.**

PARKER, M. W. AND FEIL, S. F. Pore-forming proteins toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics & Molecular Biology. Vol. 88, P. 91-142, 2005.**

PHILIPPSSEN A, IM W, ENGEL A, SCHIRMER T, ROUX B, MÜLLER DJ. Imaging the electrostatic potential of transmembrane channels: atomic probe microscopy of OmpF porin. **Biophys J. Mar;82(3):1667-76, 2002.**

PLUZHNIKOV KA, BOCHAROV DN, KONONOVA NV, SUKHANOV SV, BALASHOVA TA, ARSEN'EV AS, GRISHIN EV. Identification and structural analysis of a glycophospholipid component from the venom of ant *Paraponera clavata*. **Bioorg Khim. Sep-Oct;32(5):530-7, 2006.**

POTRICH C, BASTIANI H, COLIN DA, HUCK S, PRÉVOST G, DALLA SERRA M. The influence of membrane lipids in *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysins pore formation. **J Membr Biol. Jan;227(1):13-24, 2009.**

PUNTHEERANURAK T, STROH C, ZHU R, ANGSUTHANASOMBAT C, HINTERDORFER P. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. **Ultramicroscopy. Nov;105(1-4):115-24, 2005.**

RICHTER RP, BÉRAT R, BRISSON AR. Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. **Langmuir**. Apr 11;22(8):3497-505, 2006.

RITTIG MG, BOGDAN C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**. Jul;16(7):292-7, 2000.

SARKER MH, HU DE, FRASER PA. Regulation of cerebrovascular permeability by lysophosphatidic acid. **Microcirculation**. Jan;17(1):39-46, 2010.

SCHNUPF, P.; ZHOU, J.; VARSHAVSKY, A.; PORTNOY, D. A. Listeriolysin O Secreted by *Listeria monocytogenes* into the Host Cell Cytosol Is Degraded by the N-End Rule Pathway. **Infection and Immunity**. Vol.75 (11), P. 5135–5147, 2007.

SHAUGHNESSY LM, HOPPE AD, CHRISTENSEN KA, SWANSON JA. Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. **Cell Microbiol**. May;8(5):781-92, 2006.

SHIMUTA K, OHNISHI M, IYODA S, GOTOH N, KOIZUMI N, WATANABE H. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. **BMC Microbiol**. Dec 16;9:261, 2009.

TANAKA Y, MASHINO K, INOUE K, NOJIMA S. Mechanism of human erythrocyte hemolysis induced by short-chain phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholine. **J Biochem**. Sep;94(3):833-40, 1983.

TARZE A, DENIAUD A, LE BRAS M, MAILLIER E, MOLLE D, LAROCLETTE N, ZAMZAMI N, JAN G, KROEMER G, BRENNER C. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**. Apr 19;26(18):2606-20, 2007.

TILLEY, S. J.; ORLOVA, E. V.; GILBERT, R. J. C.; ANDREW, P. W.; SAIBIL, H. R. Structural basis of pore formation by bacterial toxin pneumolysin. **Cell**. Vol. 121, P. 247-256, 2005.

TWETEN, R. K. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming proteins. **Infection and Immunity**. Vol. 73, No. 10, P. 6199-6209, 2005.

VALEVA A, HELLMANN N, WALEV I, STRAND D, PLATE M, BOUKHALLOUK F, BRACK A, HANADA K, DECKER H, BHAKDI S. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. **J Biol Chem**. Sep 8;281(36):26014-21, 2006.

WANG R, TOWN T, GOKARN V, FLAVELL RA, CHANDAWARKAR RY. HSP70 enhances macrophage phagocytosis by interaction with lipid raft-associated TLR-7 and upregulating p38 MAPK and PI3K pathways. **J Surg Res**. Nov;136(1):58-69, 2006.

WILSON-ASHWORTH HA, JUDD AM, LAW RM, FREESTONE BD, TAYLOR S, MIZUKAWA MK, CROMAR KR, SUDWEEKS S, BELL JD. Formation of transient non-protein calcium pores by lysophospholipids in S49 Lymphoma cells. **J Membr Biol**. Jul 1;200(1):25-33, 2004.

YOUNG JA, COLLIER RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. **Annu Rev Biochem**.;76:243-65. Review, 2007.

YOUNG, J. D. -E.; YOUNG, T.M.; LU, L. P.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. **J Exp Med**. Vol. 156(6), P. 1677-90, 1982.

YOUNG, J. D.-E AND LOWREY, D. M. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. **J Biol Chem**. Vol. 264(2), P. 1077-83, 1989.

YULDASHEVA, L. N.; CARVALHO, E. B.; CATANHO M.-T.J.A.; KRASILNIKOV, O. V. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Vol. 38, P. 1061-1070, 2005.

ZHOU L, SHI M, GUO Z, BRISBON W, HOOVER R, YANG H. Different cytotoxic injuries induced by lysophosphatidylcholine and 7-ketocholesterol in mouse endothelial cells. **Endothelium**. May-Jun;13(3):213-26, 2006.

ZITZER A, WASSENAAR TM, WALEV I, BHAKDI S. Potent membrane-permeabilizing and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. **Infect Immun.** Apr;65(4):1293-8, 1997.